

Untersuchungen zum Auftreten von Transformierproteinen

Heinz-Peter Sedlmaier

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0040

Aus dem Institut für Zellbiologie der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. F. Miller

Untersuchungen zum Auftreten von Transformierproteinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Heinz-Peter Sedlmaier

aus
Taufkirchen

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. G. BIRKMAYER
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. F. MILLER
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN
Tag der mündlichen Prüfung:	24.2.1977



INHALTSVERZEICHNIS

=====

1.	EINLEITUNG UND PLAN	7
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1.	Zellkultur	13
2.1.1.	Material zur Zellkultur	13
2.1.2.	Primärkultur	17
2.1.3.	Sekundärkultur	18
2.2.	Züchtung der Viren	19
2.3.	Quantitätsbestimmung der Viren	19
2.4.	Einbau von radioaktiv-markiertem Leucin in die Zellen	20
2.5.	Trypsinbehandlung der Zellmembranproteine	21
2.6.	Zellfraktionierung	22
2.6.1.	Material zur Zellfraktionierung	22
2.6.2.	Methode der Zellfraktionierung	23
2.7.	Radioaktivitätsmessung	25
2.8.	Rechnerische Auswertung der Radioaktivitäts- messung	26
2.9.	Proteinelektrophorese auf Polyacrylamidgel	28
2.10.	Fraktionierung der Polyacrylamidgele	29
2.11.	Lichtmikroskopie	34
2.12.	Elektronenmikroskopie	34
3.	ERGEBNISSE	35
3.1.	Wachstumskurve der Hühnerembryofibroblasten	35

3.2.	Ethidiumbromidtoleranz der Hühnerembryofibroblasten	36
3.3.	Bestimmung der zur Transformation nötigen Konzentration an Rous-Sarkom-Virus	38
3.4.	Einbau von ^3H - und ^{14}C -markiertem Leucin	40
3.4.1.	in Hühnerembryofibroblasten in Gegenwart von Ethidiumbromid	40
3.4.2.	in Hühnerembryofibroblasten während der Transformation mit Rous-Sarkom-Viren mit und ohne Zusatz von Ethidiumbromid	45
3.4.3.	in nicht-transformierte Hühnerembryofibroblasten im Vergleich mit Rous-Sarkom-Virus-transformierten Hühnerembryofibroblasten mit und ohne Zusatz von Ethidiumbromid	49
3.5.	Proteinelektrophorese der subzellulären Fraktionen	53
3.5.1.	Vergleich des Proteinmusters nach Anfärben der Gele mit Coomassie-Blau und nach Radioaktivitätsmessung	53
3.5.2.	Vergleich der Markierungsmuster zwischen normalen und in Gegenwart von Ethidiumbromid inkubierten Hühnerembryofibroblasten	56
3.5.3.	Vergleich der Markierungsmuster normaler Hühnerembryofibroblasten und Hühnerembryofibroblasten während der Transformation mit Rous-Sarkom-Viren	69
3.5.4.	Vergleich der Markierungsmuster der Zellmembran-Fraktion normaler, transformierter und in Gegenwart von Ethidiumbromid mit Virus infizierter Hühnerembryofibroblasten	74
3.5.5.	Vergleich der Markierungsmuster der aus der	

	Zellmembran durch Trypsin abgelösten Proteine normaler, transformierter und in Gegenwart von Ethidiumbromid mit Virus infizierter Hühnerembryofibroblasten	79
3.6.	Elektronenmikroskopische Ergebnisse	85
4.	DISKUSSION	91
5.	ZUSAMMENFASSUNG	103
6.	LITERATURVERZEICHNIS	104

Aufzählung der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

Butyl-PBD	2-(4 tert.- <u>Butylphenyl</u>)-5-(4 <u>biphenylyl</u>)-1,2,3 oxa <u>diazol</u>
Bis-MSB	p- <u>bis</u> -(o- <u>Methylstyryl</u>)- <u>Benzol</u>
DNA	<u>Desoxy-Ribo-Nucleic-Acid</u>
EB	<u>Ethidiumbromid</u>
EDTA	(A) <u>Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat</u>
HEF	<u>Hühner-Embryo-Fibroblasten</u>
IpM	<u>Impulse pro Minute</u>
PAA	<u>Polyacrylamid</u>
PBS-A	<u>Phosphate-balanced-salts</u> , Lösung <u>A</u>
POPOP	1,4-bis-2-(5 <u>Phenyloxazolyl</u>)- <u>Benzol</u>
PPO	2,5 <u>Diphenyloxazol</u>
RNA	<u>Ribo-Nucleic-Acid</u>
UpM	<u>Umdrehungen pro Minute</u>
RSV	<u>Rous-Sarkom-Virus</u>
SDS	<u>Sodium-Dodecylsulfat</u>
TCA	<u>Trichlor-Acetat</u>
TMED	<u>Tetra-Methyl-</u> (A) <u>Ethylen-Diamin</u>
TRIS	<u>TRIS</u> (hydroxymethyl)-Aminomethan

1. EINLEITUNG UND PLAN

In den letzten Jahren konnte für verschiedene tierische Tumoren nachgewiesen werden, daß Viren bei der malignen Umwandlung der Zellen eine entscheidende Rolle spielen. Diese Viren werden in DNA- und RNA-Viren unterteilt nach der Art der Nukleinsäuren, die das genetische Material der Viren bilden. RNA-Viren konnten aus verschiedenen Leukosen und Sarkomen von Hühnern, Ratten, Mäusen, Katzen und Affen isoliert werden. Mit einigen dieser RNA-Viren ließen sich analoge Tumoren in der gleichen Tierart induzieren. Für eine virale Ätiologie anderer tierischer Geschwülste spricht die Möglichkeit der zellfreien Übertragung.

Aus begreiflichen Gründen läßt sich der Versuch einer zellfreien Übertragung menschlicher Tumoren nicht durchführen. Auf der Basis der Koch'schen Regeln kann deshalb der endgültige Beweis für eine Virusätiologie menschlicher Krebserkrankungen nicht erbracht werden. Man kann jedoch nach Hinweisen auf virale Information in menschlichen Malignomen suchen, die im normalen Ursprungsgewebe fehlen. Solche Indizien lassen sich mit biochemischen und zellbiologischen Methoden finden. Für virale Information in menschlichen Tumoren spricht:

- a) der Nachweis einer viralen 70S-RNA
- b) der Nachweis einer viralen RNA-gesteuerten
DNA-Polymerase (= "Reverse Transcriptase")
- c) der Nachweis eines internen gruppenspezifischen

schen Antigens

- d) der Nachweis eines virusspezifischen Hüllen-
antigens
- e) der Nachweis virusspezifischer Sequenzen in
der zellulären DNA und RNA
- f) der Nachweis einer Virusproduktion in Tumor-
zellen
- g) die Induktion des Tumors durch die isolierten
Viren; diese Methode entspricht im Wesentli-
chen einer zellfreien Tumorübertragung.

Einige dieser Indizien konnten sowohl bei soliden menschlichen Tumoren - wie Mammakarzinom (Seman et al., 1971, Bowen et al., 1973), malignem Melanom (Birkmayer et al., 1972) und Gliom (Cu-
atico et al., 1973, Birkmayer et al., 1974) - als auch bei Tu-
moren des blutbildenden (Baxt et al., 1972) und lymphatischen
Systems (Gallagher & Gallo, 1975) gefunden werden.

Auf der Basis umfangreicher Untersuchungen mit RNA-Tumurviren
haben Todaro und Huebner (1972) ein Modell entwickelt, mit dem
man die Beteiligung von Viren an der Entstehung bösartiger Ge-
schwülste erklären kann. Mit Hilfe dieses Modells, das allge-
mein als "Onkogentheorie" bekannt ist, wird auch verständlich,
welche Rolle chemische und physikalische Noxen bei der Kanzero-
genese spielen (Abb. 1). Huebner und Todaro postulieren, daß
jede einzelne Zelle aller Wirbeltiere die genetische Informa-
tion für eine maligne Zellumwandlung und für die Bildung von
Viren enthält. Danach codiert dieser Teil der zelleigenen DNA

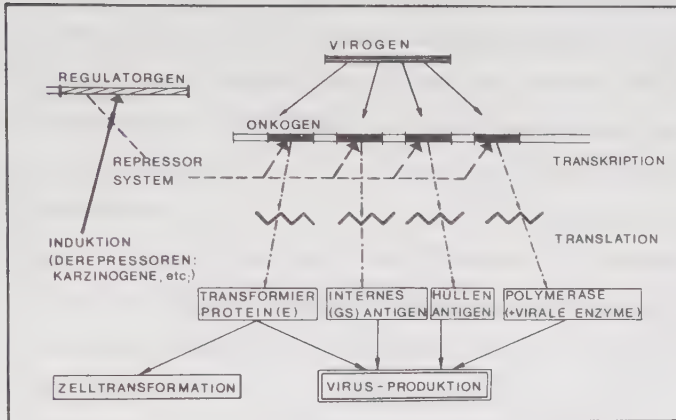


Abb. 1: Schematische Darstellung der Onkogentheorie für die Regulation der Virogene und des Onkogens bei der Karzinogenese nach Todaro und Huebner.

- das sog. Virogen - die virusspezifischen Proteine der Hüllen- und der Kapsidmembran und der "Reverse Transcriptase" sowie einiger anderer viraler Enzyme, die alle für die Virusvermehrung notwendig sind; aufgrund genetischer und molekularbiologischer Studien weiß man, daß diese viralen Proteine für die Entstehung und die Aufrechterhaltung des transformierten Zustands der Zellen nicht erforderlich sind, sondern daß dafür andere Proteine verantwortlich sind (Vogt, 1973). Der genetische Code für diese Proteine - sie werden von Todaro und Huebner als "Transformierproteine" bezeichnet - liegt im sog. "Onkogen". So enthält das Onkogen - wie auch schon sein Name andeutet - die genetische Information für die maligne Zelltransformation. Onkogen und Virogen werden wie die meisten zellulären Gene durch ein Repressor-

system reguliert, das die phänotypische Ausbildung dieser Gene verhindert. Möglicherweise kann dieses Repressorsystem durch verschiedene Agentien beeinflusst werden. Chemische Kanzerogene, ionisierende Strahlen, aber auch ein zusätzliches exogenes Virus könnten das Repressorsystem inaktivieren. Dabei sind verschiedene Variationen denkbar: Einmal können Virogen und Onkogen dereprimiert werden; in diesem Fall kommt es sowohl zur malignen Umwandlung der Zelle wie auch zur Produktion von Viren. Wenn dagegen nur das Virogen oder ein oder mehrere Teile davon ihren Repressor verlieren, werden ein oder mehrere virusspezifische Proteine gebildet, oder es entstehen ganze Virus-Partikel; dabei wird die Zelle aber nicht transformiert. Wird dagegen nur das Onkogen realisiert, dann werden neue Makromoleküle produziert, die für die veränderten Eigenschaften der transformierten Zelle verantwortlich sind, - die Transformierproteine. Untersuchungen von Todaro und Huebner (1972) ergaben, daß diese Proteine bei der Zelltransformation durch Tumoviren synthetisiert werden und entweder die Ursache der Zellumwandlung sind oder zumindest den Prozess der Transformation steuern. Ein Indiz für ihre Existenz brachte die Untersuchung von Richert und Hare (1972): Sie konnten zeigen, daß der Farbstoff Ethidiumbromid (EB) wohl die Zelltransformation von Hühnerembryofibroblasten (HEF) durch Rous-Sarkom-Viren (RSV), nicht aber die Virusvermehrung hemmt. Entsprechend der Onkogenhypothese würde das bedeuten, daß RSV in Gegenwart von EB nur das Repressorsystem des Virogens, nicht aber das des Onkogens inaktiviert. Es kommt also zur Synthese virusspezifischer Proteine und damit zur Aus-

bildung von Viren, aber nicht zur Umwandlung der Zelle. Der Befund, daß EB spezifisch die Bildung der Transformierproteine verhindert, könnte zum Nachweis dieser Proteine benutzt werden und war die Grundlage für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Ich wollte herausfinden, ob bei der Transformation durch onkogene RNA-Viren neue Proteine synthetisiert werden, und inwieweit diese Proteine auch gebildet werden, wenn die Zellen in Gegenwart von EB mit Viren infiziert werden.

Als Versuchsmodell diente mir das Hühnerembryofibroblasten-Rous-Sarkom-Virus- System. RSV ist imstande, HEF-Kulturen in vitro zu transformieren. Die Frage war nun, ob bei diesem Vorgang neue Proteine synthetisiert werden, und in welche subzelluläre Komponenten sie eingebaut werden. Isoliert wurden dann folgende Zellfraktionen: Kerne, Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum und Zellmembranen. Von diesen Fraktionen wurde die Proteinsyntheserate gemessen und ihr Proteilmuster nach elektrophoretischer Auftrennung verglichen. Im Elektrophoresemuster suchte ich nach Proteinen, die bei der Transformation mit RSV gebildet werden, und deren Synthese durch EB gehemmt wird. Dieser Nachweis wird dadurch erschwert, daß die Transformierproteine im Vergleich zu den übrigen Proteinen einer Zelle in sehr geringen Konzentrationen vorkommen. Eine Möglichkeit, sie von den vielen anderen Zellproteinen zu unterscheiden, bestand darin, sie während ihrer Synthese spezifisch und hoch durch radioaktive Aminosäuren zu etikettieren. Diese Untersuchung wurde im zweiten Teil der Untersuchung durchgeführt, nachdem im ersten Teil der Einfluß von EB auf die Proteinsynthese normaler HEF

analysiert wurde.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellkultur

2.1.1. Material zur Zellkultur

HEF wurden bei dieser Arbeit zunächst in Medium 199 von Biocult gezüchtet, das folgende Zusammensetzung hat:

<u>Aminosäuren</u>	mg/l	<u>Vitamine</u>	mg/l
L-Alanin	25,0	p-Aminobenzoesäure	0,050
L-Arginin HCl	7,0	Ascorbinsäure	0,050
L-Asparaginsäure	30,0	D-Biotin	0,010
L-Cystein HCl	0,1	Calciferol	0,100
L-Cystin	20,0	D-Ca-Pantothenat	0,010
L-Glutaminsäure	67,0	Cholesterin	0,200
L-Glutamin	100,0	Cholin-Chlorid	0,500
L-Glycin	50,0	Folsäure	0,010
L-Histidin HCl H ₂ O	22,0	i-Inositol	0,050
L-Hydroxyprolin	10,0	Menadion	0,010
L-Isoleucin	20,0	Nicotinamid	0,025
L-Leucin	60,0	Nicotinsäure	0,025
L-Lysin HCl	70,0	Pyridoxal HCl	0,025
L-Methionin	15,0	Pyridoxin HCl	0,025
L-Phenylalanin	25,0	Riboflavin	0,010
L-Prolin	40,0	Thiamin HCl	0,010
L-Serin	25,0	DL-Tocopherolphosphat	0,010
L-Threonin	30,0	Tween 80	5,000
L-Tryptophan	10,0	Vitamin A	0,100
L-Tyrosin	40,0		
L-Valin	25,0		

<u>Anorganische Salze und andere Komponenten</u>		mg/l	
CaCl ₂ 2H ₂ O	186,0	Adenosin-5'-	
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,7	Triphosphat	
KCl	400,0	disodium-	1,00
KH ₂ PO ₄	60,0	tetrahydrat (ATP)	
MgCl ₂ 6H ₂ O	100,0	Deoxyribose	0,50
MgSO ₄ 7H ₂ O	100,0	Dextrose	1000,00
NaCl	8000,0	L-Glutathion	0,05
NaHCO ₃	1250,0	Guanin HCl H ₂ O	0,33
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	94,0	Hypoxanthin	0,30
Adenin HCl 2H ₂ O	12,1	Phenol-Rot	20,00
Adenosin-5'-Mono-	0,2	Ribose	0,50
Phosphorsäure-		Sodium-Acetat 3H ₂ O	83,00
dihydrat (AMP)		Thymin	0,30
		Uracil	0,30
		Xanthin	0,30

pH... 7,2

Hinzugefügt wurde: 10% fötales Kälberserum
0,85 g/l NaHCO₃
50 E/ml Penicillin
50 µg/ml Streptomycin.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich dann, daß dieses hochwertige Medium zur Züchtung der Hühnerembryofibroblasten nicht notwendig ist. Wir wechselten daher auf das Minimal Essential Medium modifiziert nach Eagle mit Earle's Salzen:

<u>Aminosäuren</u>	mg/l	<u>Vitamine</u>	mg/l
L-Arginin HCl	126,4	D-Ca-Pantothenat	1,0
L-Cystin	24,0	Cholin-Chlorid	1,0
L-Glutamin	292,0	Folsäure	1,0
L-Histidin HCl H ₂ O	41,9	i-Inositol	2,0
L-Isoleucin	52,5	Nicotinamid	1,0

L-Leucin	52,4	Pyridoxal HCl	1,0
L-Lysin HCl	73,1	Riboflavin	0,1
L-Methionin	14,9	Thiamin HCl	1,0
L-Phenylalanin	33,0		
L-Threonin	47,6		
L-Tryptophan	10,2		
L-Tyrosin	36,2		
L-Valin	46,8		

Anorganische Salze und andere Komponenten:

CaCl ₂ 2H ₂ O	265,0
KCl	400,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	200,0
NaCl	6800,0
NaHCO ₃	2200,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	140,0
Dextrose	1000,0
Phenol-Rot	10,0

pH... 7,0

Dieses Medium wurde als Trockenpulver bezogen, in bidestilliertem Wasser gelöst, durch ein Millipore-Membranfilter mit einer Porengröße von 0,22 μ steril filtriert und mit folgenden Zusätzen angereichert:

6% fötales Kälberserum
 20 mM L-Glutamin
 0,63 g/l NaHCO₃
 50 E/ml Penicillin
 50 μ g/ml Streptomycin
 20 μ g/ml Gentamycin.

Für die Zellkulturen wurden noch folgende Lösungen verwendet:

Phosphate-balanced-salt - Solution A:

NaCl	8,0	g
KCl	0,2	g
Na ₂ HPO ₄	2,898	g
KH ₂ PO ₄	0,2	g
H ₂ O bidestilliert ad 1000 ml.		

Trypsin-Versen: Mit diesem Gemisch werden die Zellen schneller und schonender voneinander und von der Wand des Kulturgefäßes abgelöst als mit reinem Trypsin. 2,5 g Trypsin von Difco wurde in 1 l PBS-A unter ständigem Rühren einige Stunden bei 50° inkubiert, und die trübe Lösung dann durch einen Faltenfilter filtriert. 0,5 g Versen-EDTA-Titriplex III wurde in 1 l PBS-A gelöst und zusammen mit der Trypsinlösung steril filtriert.

Sterilitätskontrollen: Von allen steril filtrierten Lösungen wurden Sterilitätskontrollen durchgeführt, um eine spätere Infektion der Zellkulturen zu verhindern. Dazu wurde jeweils 1 - 2 ml dieser Lösung in Nährbouillon 4 - 5 Tage lang bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Nährbouillon wurde hergestellt aus:

10,0	g	Pepton
2,5	g	Hefe-Extrakt
5,0	g	NaCl
1	l	H ₂ O bidestilliert.

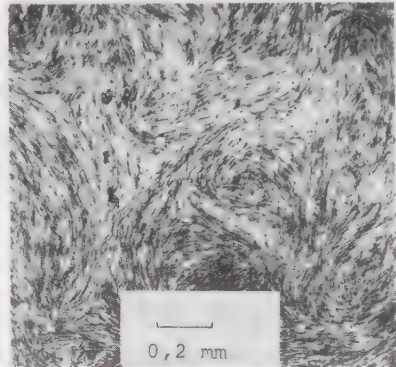
Die Lösung wurde autoklaviert; vor Gebrauch wurden 3% sterile Glucoselösung hinzugefügt.

2.1.2. Primärkultur

Für jede Primärkultur wurden etwa 10 befruchtete Hühnereier 11-12 Tage bei 37° inkubiert. Unter sterilen Kautelen wurden die Embryonen aus den Eiern entnommen und mehrmals mit PBS-A gewaschen. Um möglichst reine Fibroblastenkulturen zu erhalten, wurden Kopf und Eingeweide entfernt. Knorpelzellen und andere noch im Körper zurückgebliebene Zellen wurden in der Kultur in kurzer Zeit von den viel schneller sich vermehrenden Fibroblasten überwachsen. Deshalb konnte der ganze restliche Körper der Hühnerembryonen zur Primärkultur verwendet werden. Dazu wurde er zunächst mit der Schere zerkleinert und in ein Trypsiniergefäß überführt. Die ca. 1mm³ großen Gewebestücke wurden dann bei 37° in Trypsin-Versen inkubiert, um die Zellen voneinander abzulösen. Nach 5 min wurde jeweils wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und durch frisches Trypsin-Versen ersetzt. Auf diese Weise wurden 4 Überstände mit Zellsuspensionen gewonnen, von denen die erste wegen ihres hohen Gehalts an Erythrozyten verworfen werden mußte. Bei der Weiterverarbeitung der 3 anderen Überstände wurden zunächst die noch vorhandenen größeren Gewebestückchen entfernt, indem die Zellsuspensionen durch vierfachen Mull filtriert wurden. Zum Filtrat wurde dann sofort Medium mit fötalem Kälberserum gegeben, um die Wirkung des Trypsins zu inhibieren. Danach wurden die Zellen bei 800 UpM abzentrifugiert und noch zweimal mit Medium mit fötalem Kälberserum gewaschen. Die Hühnerembryofibroblasten wurden nun in einer Konzentration von 0,5 - 1 x 10⁶/ml in etwa 25 Glasvierkantflaschen eingesät;

in jede dieser Glasvierkantflaschen mit einer Wachstumsfläche von 165 cm^2 wurden 80 ml Zellsuspension abgefüllt. Nach etwa 48 Stunden war der Zellrasen in den Vierkantflaschen so dicht (Abb. 2), daß eine Sekundärkultur der Hühnerembryofibroblasten angelegt werden mußte.

Abb. 2: Vollständig geschlossener Zellrasen von Hühnerembryofibroblasten.



2.1.3. Sekundärkultur

Bei der Sekundärkultur wurden zuerst die noch nicht angewachsenen Zellen zusammen mit dem Medium aus den Zuchtgefäßen rasch abgekippt. Nach einmaligem Abwaschen des Zellrasens mit PBS-A - um die Reste des Mediums und besonders des fötalen Kälberserums zu entfernen - wurden die Zellen mit Trypsin-Versen (5ml je Flasche) 5 min lang bei 37° inkubiert. Die Zellen lösten sich dabei vom Boden des Zuchtgefäßes und konnten mit einer Pipette aufgenommen werden. Durch Zugabe von Medium mit fötalem Kälberserum wurde die enzymatische Wirkung des Trypsins gehemmt. Danach wurden die Zellen bei 800 Upm abzentrifugiert, in Medium

suspendiert und in Rollerflaschen mit einer Wachstumsfläche von 840 cm² eingesät. Dabei wurden die Zellen aus 25 Vierkantflaschen ohne Zählung in 20 Rollerflaschen umgesetzt. 48 Stunden nach der Einsaat mußte das Medium gewechselt werden. Nach weiteren 48 - 72 Stunden war der Zellrasen so dicht, daß die Zellen - wie auf der vorigen Seite beschrieben - von der Glasoberfläche abtrypsiniert werden konnten, um sie für die Einbauversuche mit radioaktiv markiertem Leucin zu verwenden, wie es unter 2.4. beschrieben ist.

2.2. Züchtung der Viren

Rous-Sarkom-Viren (RSV) vom Stamm Bratislava B 77 wurden auf Zellkulturen von HEF gegeben und transformierten die Zellen. Die transformierten Fibroblasten produzierten große Mengen von RSV. Zum Nachweis der Transformation und zur Gewinnung der Viren wurde bei jedem Mediumwechsel das verbrauchte Medium, in dem sich auch die neuproduzierten Viren befanden, zunächst bei -70° eingefroren. Später wurde von diesen Überständen das 100 000 x g Sediment abzentrifugiert. In diesem Sediment sollten sich auch die Viren befinden. Der Virusnachweis gelang durch den Test auf Reverse-Transcriptase-Aktivität und durch elektronenoptische Untersuchung des Sediments.

2.3. Quantitätsbestimmung der Viren

Die Menge und Infektiosität der Viren wurde mit dem Test auf

umgekehrte Transcriptase nach Baltimore et al.(1973) bestimmt. Nach Keloff et al.(1972) ist der Einbau an Radioaktivität beim Test auf umgekehrte Transcriptase der Infektiosität der Virus-suspension proportional.

2.4. Einbau von radioaktiv-markiertem Leucin in die Zellen

Nach dem Ernten der Zellen, wie es in 2.1.3. beschrieben ist, wurden die abzentrifugierten Zellen in Medium mit fötalem Kälberserum suspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal mit Medium mit fötalem Kälberserum und zweimal mit Medium ohne Leucin wiederholt. Um auch den intrazellulären Leucingehalt der Zellen zu vermindern, wurden die Fibroblasten 30 min in Medium ohne Leucin bei 37° inkubiert. Danach wurden 150 µCi ¹⁴C-Leucin dazugegeben, das in einer weiteren Inkubation bei 37° für 30 min in die zu dieser Zeit in den Zellen synthetisierten Proteine eingebaut wurde. Die Zellen wurden dann abzentrifugiert und 10 min mit einem Überschuß an nicht-markiertem Leucin nachinkubiert, um den weiteren Einbau radioaktiv-markierten Leucins zu verhindern. Die sedimentierten Zellen wurden noch zweimal mit Medium gewaschen. Damit waren die Zellproteine vormarkiert, und die HEF konnten in zwei Fraktionen geteilt werden, in die Kontroll- und die Test-Fraktion. Für die verschiedenen Versuche wurden die beiden Fraktionen in unterschiedlichen Medien suspendiert:

Kontroll-Fraktion: In normalem Medium

oder

in normalem Medium mit RSV

Test-Fraktion: In normalem Medium mit EB

oder

in normalem Medium mit RSV und EB

In den jeweiligen Medien wurden die Zellen bei 37° inkubiert, 30 min vor dem Erreichen der im jeweiligen Versuch angestrebten Zeit abzentrifugiert, in Medium ohne Leucin suspendiert und erneut sedimentiert. Die Zellen wurden nochmals 30 min im entsprechenden Medium (normales Medium mit oder ohne RSV bzw. Medium mit EB mit oder ohne RSV) inkubiert; diese Medien enthielten aber kein Leucin, um auch vor der Nachmarkierung mit ^3H -Leucin den intrazellulären Gehalt an Leucin zu erniedrigen. Zur Nachmarkierung wurde zu jeder Fraktion (Kontroll- und Test-Fraktion) je 1 mCi ^3H -markierten Leucins zugegeben. Nach 30 min Inkubation zur Nachmarkierung wurden die Zellen sedimentiert und 10 min in Medium mit einem Überschuß an nicht-markiertem Leucin inkubiert, um den Einbau von ^3H -Leucin möglichst gleichzeitig und schlagartig zu beenden. Nach 10 min wurden die Zellen abzentrifugiert, dreimal in PBS-A suspendiert und jeweils bei 800 UpM sedimentiert.

2.5. Trypsinbehandlung der Zellmembranproteine

Um Proteine, insbesondere Glykoproteine, von der Oberfläche der Zellen abzulösen, wandten wir das von Buck et al. (1970)

beschriebene Verfahren an. Voraussetzung dafür war, daß die Zellen zu Beginn des Markierungsversuchs nicht mit Trypsin-Versen von der Glasoberfläche der Rollerflaschen abgelöst, sondern mechanisch mit einem sterilen Silikonschaber abgeschabt wurden. Im Anschluß an den Markierungsversuch, wie er unter 2.4. beschrieben ist, wurden die Zellen in 10 ml 0,1% Trypsin suspendiert und 15 min bei 37° inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von 10 mg Trypsininhibitor aus Sojabohnen die enzymatische Wirkung des Trypsins auf die Zellen gehemmt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 800 UpM wurde der Überstand, in dem die abgelösten Proteine zu suchen waren, lyophilisiert. Mit 95% Äthanol wurde das Protein ausgefällt, abzentrifugiert und in 1 ml H₂O gelöst. Um störende Ionen der PBS-A zu entfernen, wurde die Proteinlösung 24 Stunden gegen H₂O dialysiert. Die Lösung wurde dann erneut lyophilisiert, und das Protein wurde in 50 µl eines Puffers gelöst. Dieser Puffer bestand aus:

10 mM TRIS-HCl pH 8,5
2 % SDS
2 % Mercaptoäthanol
6 M Harnstoff.

Die Proteine dieser Lösung konnten dann in einem PAA-Gel elektrophoretisch getrennt werden.

2.6. Zellfraktionierung

2.6.1. Material zur Zellfraktionierung

Bei der Zellfraktionierung wurden verschiedene Puffer verwen-

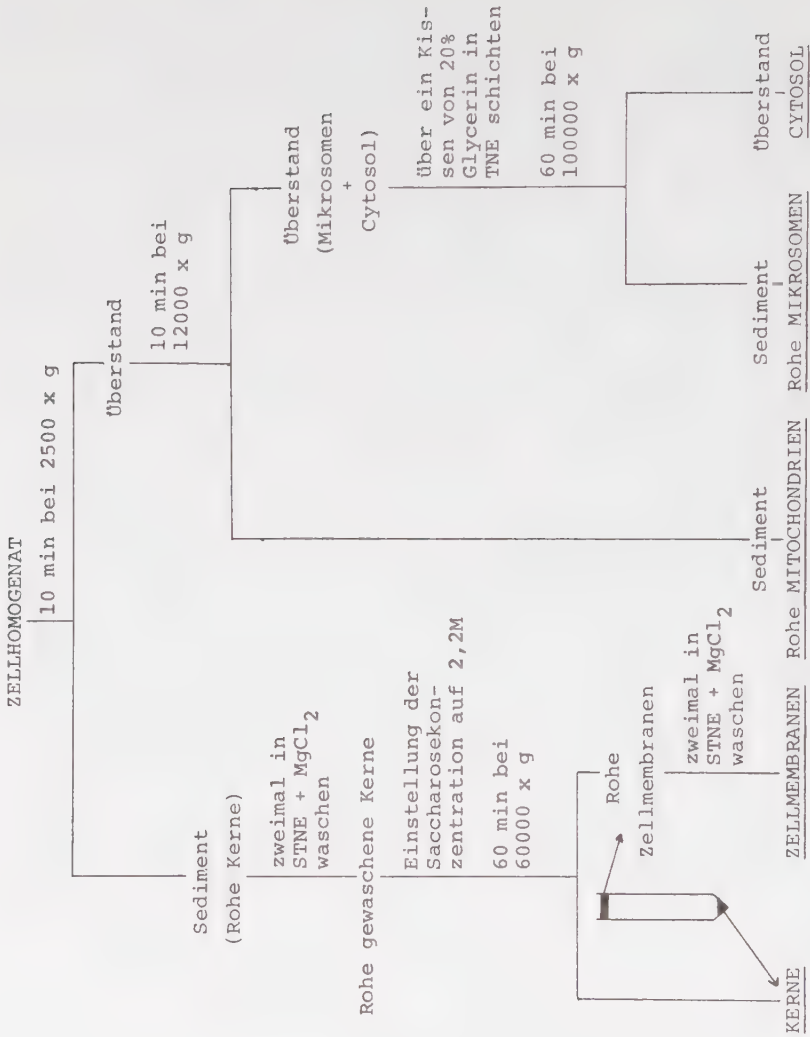
det, die in dem Schema auf Seite 24 abgekürzt angegeben sind.

Dabei enthält:

TE Puffer	10 mM TRIS-HCl, 2mM EDTA, pH 8,3
TNE Puffer	10 mM TRIS-HCl, 2mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,3
STNE Puffer	10 mM TRIS-HCl, 2mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,32 M Saccharose, pH 8,3
STNE Puffer + MgCl ₂	10 mM TRIS-HCl, 2mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,32 M Saccharose, 3 mM MgCl ₂ , pH 8,3.

2.6.2. Methode der Zellfraktionierung

Die Zellen wurden zuerst in 5 ml TNE Puffer suspendiert. Um die Zellmembranen aufzubrechen, wurden die Zellen durch Eintauchen des Röhrchens mit der Zellsuspension in flüssigen Stickstoff rasch auf -70° gekühlt. Im Verlauf einer Stunde wurden die Zellen wieder auf 37° erwärmt. Dieses Verfahren wurde zweimal wiederholt. In einem Glas-Teflon-Potter wurde die Suspension dann durch 20-maliges Auf- und Abführen des Kolbens homogenisiert. Zum Homogenat wurde Saccharose bis zu einer Endkonzentration von 0,32 M hinzugefügt. Die weitere Zellfraktionierung verlief nach dem Schema auf Seite 24 (modifiziert nach Buck et al., 1974). Nach der Präparation wurden alle Fraktionen in TE Puffer gelöst.



2.7. Radioaktivitätsmessung

Das Protein der einzelnen subzellulären Fraktionen wurde mit 15% TCA ausgefällt und abzentrifugiert. Das Sediment wurde einmal in 15% TCA, zweimal in 5% TCA und zweimal in einem Gemisch von Äthanol und Äther im Verhältnis 3:1 gewaschen, in Äther suspendiert, abzentrifugiert und an der Luft getrocknet. Das ausgefallte Protein wurde gelöst in 50 µl eines Puffers aus:

2% Sodiumdodecylsulfat
1% Mercaptoäthanol
10mM TRIS-HCl pH 8,3
6 M Harnstoff.

5 µl dieser Proteinlösung wurden in 15 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst. Verwendet wurden drei verschiedene Szintillationsflüssigkeiten:

- a) 600 ml Toluol + 400 ml Äthylenglykolmonomethyläther + 6 g Butyl-PBD
- b) 600 ml Toluol + 400 ml Äthylenglykolmonomethyläther + 5 g PPO + 0,1 g POPOP
- c) 600 ml Toluol + 400 ml Äthylenglykolmonomethyläther + 6 g einer Mischung aus 91% PPO und 9% Bis-MSB.

Innerhalb eines Versuchs wurde nur eine dieser Szintillationsflüssigkeiten verwendet.

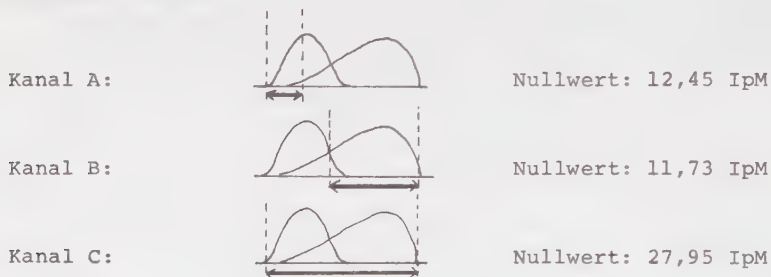
Zur Radioaktivitätsmessung standen uns zwei verschiedene Flüssigkeitsszintillationszähler zur Verfügung:

- a) Beckmann LS 330
- b) Packard Tricarb

2.8. Rechnerische Auswertung der Radioaktivitätsmessung

Für beide Flüssigkeitsszintillationszähler wurde je ein Programm erstellt, das die Nullwerte in den einzelnen Zellkanälen und die Überlappung der Energieprofile von ^3H und ^{14}C berücksichtigte.

a) Beckmann LS 330



Messungen mit reinen ^3H - und ^{14}C -Proben ergaben, daß 88% der in Kanal B gezählten IpM auch im Kanal A gezählt wurden. Der Kanal B zählte aber nur die Aktivität von ^{14}C . Folgender Ansatz berücksichtigte diese Meßergebnisse:

$$^3\text{H} = A - 12,45 - (B - 11,73) \times 0,88$$

$$^{14}\text{C} = C - 27,95 - ^3\text{H}$$

Neben der absoluten Anzahl der ^3H - und ^{14}C -Impulse pro Minute wurde auch der Quotient aus beiden berechnet:

$$\text{Quotient} = \frac{^3\text{H}}{^{14}\text{C}}$$

Im programmierbaren Taschenrechner HP-65 von Hewlett-Packard wurden mit folgendem Programm die Werte der ^3H -IpM, der ^{14}C -

IpM und des Quotienten aus beiden berechnet:

```
LBL A DSP . 1 STO 3 Rv STO 2 Rv STO 1 RCL 2
11,73 - 0,88 x CHS RCL 1 + 12,45 - STO 4 RTN
LBL B RCL 3 27,95 - RCL 4 - STO 5 RTN
LBL C DSP . 2 RCL 4 RCL 5 % RTN
```

Eingegeben wurde: Wert aus Kanal A Enter Wert aus Kanal B
Enter Wert aus Kanal C

Nach Betätigung der Programmtaste A wurde der ^3H -Wert angezeigt, die Taste B codierte den Wert für ^{14}C und die Taste C den Quotienten aus den ersten beiden Werten.

b) Packard Tricarb

Nullwert im Kanal A : 15,8 IpM

Nullwert im Kanal B : 9,1 IpM

Während im Kanal A nur ^{14}C -Impulse gemessen wurden, wurden im Kanal B außer den ^3H -Impulsen auch 39% der ^{14}C -Impulse aus Kanal A gezählt. Daraus ergaben sich folgende Formeln:

$$^3\text{H} = B - 9,1 - (A - 15,8) \times 0,39$$

$$^{14}\text{C} = A - 15,8$$

Der HP-65 Taschenrechner wurde folgendermaßen programmiert:

```
LBL A DSP . 1 STO 2 Rv STO 1 15,8 - STO 3 RCL
3 0,39 x CHS Enter RCL 1 9,1 - + STO 4 RTN
LBL B RCL 3 RTN
LBL C DSP . 2 RCL 4 RCL 3 % RTN
```

Eingegeben wurde: Wert aus Kanal A Enter Wert aus Kanal B.
Nach Drücken der Programmtaste A wurde der ^3H -Wert berechnet,
Programmtaste B codierte wieder den ^{14}C -Wert und Programmtaste
C den Quotienten aus beiden Werten.

2.9. Proteinelektrophorese auf Polyacrylamidgel

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde auf
Flach- und Rundgelen durchgeführt. Das 7,5%ige Polyacrylamid-
gel setzte sich so zusammen:

100 ml Puffer (0,2 M TRIS-HCl, 0,2% SDS, pH: 8,3)
67,5 ml Acrylamidlösung (22,6 g Acrylamid, 0,6 g Methy-
lenbisacrylamid, ad 100 ml H_2O)
29 ml H_2O
3 ml Ammoniumperoxidisulfat
0,4 ml TMED (Tetramethyläthylendiamin)

Der Puffer in der Elektrophoresekammer bestand aus:

0,1 M TRIS-HCl
0,1 % SDS
pH 8,5.

Nach dem Polymerisieren des Acrylamids wurde Ammoniumperoxidi-
sulfat und andere störende Ionen in einem 2-3stündigen Vorlauf
der Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 V ent-
fernt. Bei der elektrophoretischen Aufteilung der Proteine der
subzellulären Fraktionen wurde dagegen zunächst nur eine kon-

stante Spannung von 30 V für 45 min angelegt, um die Proteine ins Gel einwandern zu lassen. Dann konnte die Spannung auf 100 V erhöht werden. Auf ein Gel wurde bei jeder Elektrophorese Cytochrom C aufgetragen; beendet wurde die Elektrophorese, wenn das sichtbare Cytochrom C eine Laufstrecke von 6,3 cm erreicht hatte. Einige Gele wurden mit 0,1%igem Coomassie-Blau in einem Gemisch aus Methanol : Eisessig : Wasser im Verhältnis

5 : 1 : 5 (v/v/v)

zwei Stunden lang angefärbt, anschließend in

Methanol : Eisessig : Wasser im Verhältnis

5 : 1 : 5 (v/v/v)

entfärbt und bei 575 nm densitometriert. Die meisten Gele wurden direkt fraktioniert.

2.10. Fraktionierung der Polyacrylamidgele

In dem von uns verwendeten Gilson-Gelfractionator wird das Gel mit jeweils 1 mm Vorschub durch ein engmaschiges Sieb (Porengröße etwa 0,25 mm) gepreßt, wobei es in kleine Stücke zerquetscht wird. Diese Stückchen spült dann eine automatische Pumpe mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit in ein Zählgläschen, bevor der Fraktionator zum nächsten Gläschen weiterfährt. Für die Fraktionierung von Flachgelen entwarfen und bauten wir einen Adapter zum Gelfraktionator, den Gilson nicht liefern konnte. Auf den Abbildungen 3 - 8 sind die Einzelteile dieses Flachgeladapters dargestellt.

Das ganze Flachgel wird auf die Platte mit dem eingesiegelten Millimeterpapier (1) gelegt; mit dem Schneidegerät (2) werden die Laufstrecken der einzelnen Proben aus dem Gel geschnitten. Die Gelstreifen werden in die Rinne (4) des Plexiglasblocks (3) gelegt, die mit dem Deckel (5) verschlossen wird. In die breite Aussparung (6) des Plexiglasblocks (3) wird die Schneidekammer (7) gelegt, in die das Gel mit dem Schieber (8) eingeführt wird. Die Schneidekammer wird dann in den Stab (9) eingespannt, und der ganze Stab wird auf den Gelfraktionator geschraubt.

Abb. 3 - 8 : Einzelteile des Flachgeladapters für den Gilson-Gelfraktionator.

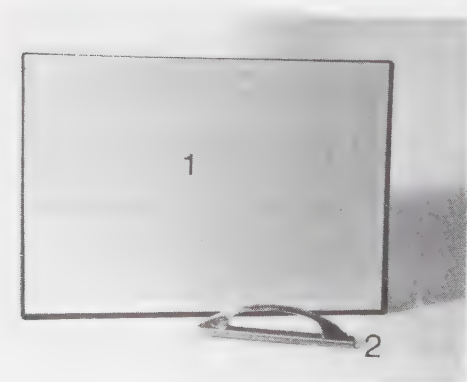


Abb. 3: Platte mit Schneidegerät

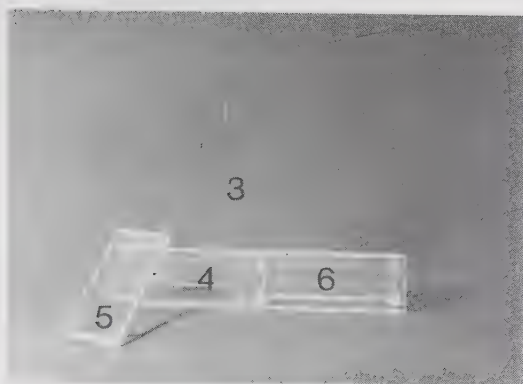


Abb. 4: Plexiglasblock mit Deckel

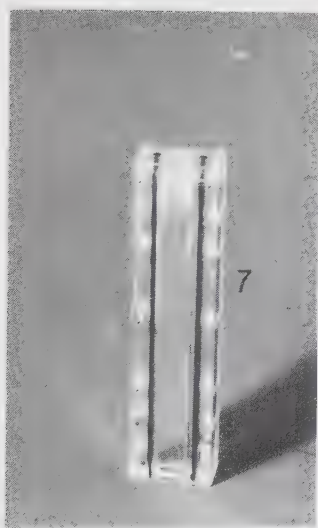


Abb. 5: Schneidekammer

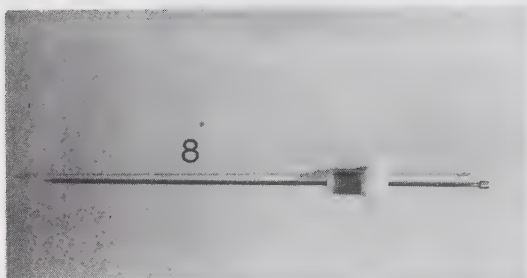


Abb. 6: Schieber



Abb. 7: Stab

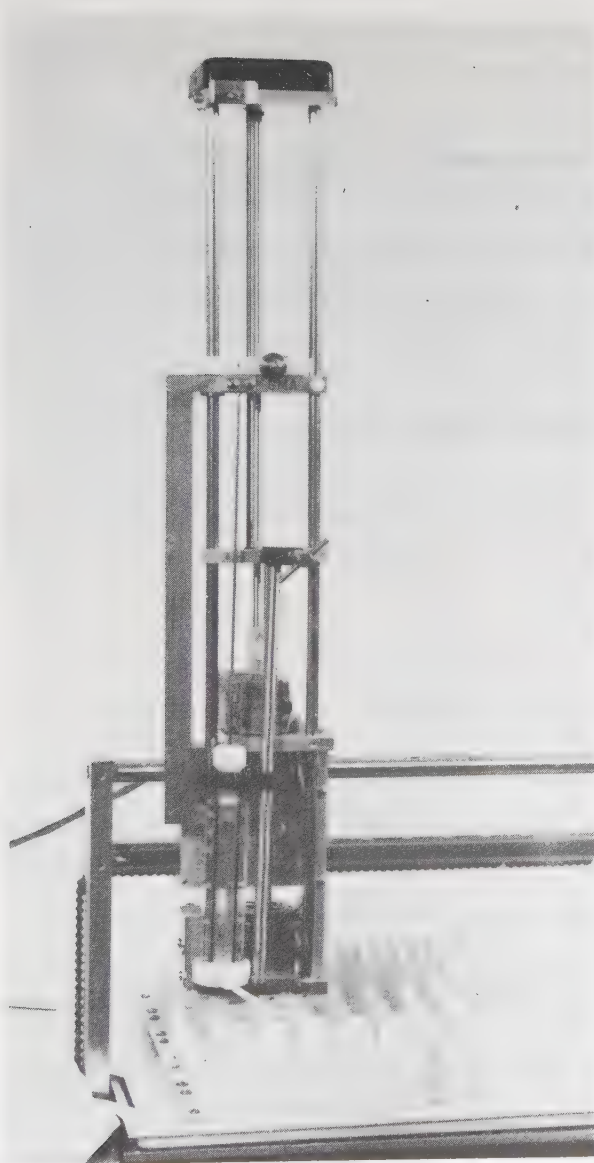


Abb. 8: Fertig montierter Flachgeladapter am Gilson-Gelfractionator

2.11. Lichtmikroskopie

Zellkulturen für lichtmikroskopische Betrachtungen wurden in Leighton-Tubes angelegt. Nach ausreichend langer Kultivierung wurden die Plättchen mit dem Zellrasen mehrmals mit PBS-A gewaschen, nach Bouin fixiert, nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt und mit dem Ultraphot III photographiert.

2.12. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenoptische Untersuchung wurden 50 - 100 μ l Zellsuspension 30 min lang bei 4° in folgender Lösung fixiert:

2% OsO ₄ in H ₂ O	500 μ l
0,2 M Cacodylat-Puffer	500 μ l
25% Glutaraldehyd	100 μ l.

Nach Abzentrifugieren und einmaligem Waschen in 0,1 M Cacodylat wurden die Zellen in Äthanol entwässert und in Epon eingebettet; Ultradünnschnitte davon wurden in einem Siemens-Elektronenmikroskop IA oder 102 untersucht.

3. ERGEBNISSE

3.1. Wachstumskurve der Hühnerembryofibroblasten

Zur Bestimmung der Wachstumskurve wurden die HEF in einer Konzentration von $2 \times 10^6/\text{ml}$ in Plastik-Zuchtgefäße mit einer Wachstumsfläche von 75 cm^2 eingesät. In Abständen von 12 Stunden wurden die Zellen aus jeweils zwei Zuchtgefäßen mit Trypsin abgelöst und in einer Bürker-Zählkammer gezählt.

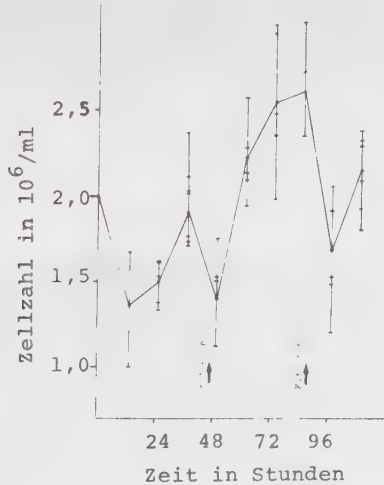


Abb. 9: Wachstumskurve der Hühnerembryofibroblasten

Die Kurve (Abb. 9) zeigt, daß etwa 75% der eingesäten Zellen anwachsen; außerdem wird beim Mediumwechsel, der alle 48 Stunden vorgenommen wurde, offenbar ein Teil der Zellen mit dem verbrauchten Medium abpipettiert. Den ersten Gipfel der Wachs-

tumskurve vor der ersten Fütterung nutzte ich dadurch aus, daß ich die Sekundärkultur etwa 48 Stunden nach der Primärkultur durchführte. Den höchsten Gipfelpunkt der Kurve benutzte ich, wenn ich nach der Sekundärkultur die Zellen mit einem einzigen Mediumwechsel etwa 96 Stunden bis zur Durchführung des Einbauversuchs weiterzüchtete.

3.2. Ethidiumbromidtoleranz der Hühnerembryofibroblasten

Um festzustellen, welche Konzentration an EB Hühnerembryofibroblasten ertragen, inkubierte ich die Zellen mit steigenden Konzentrationen an EB. Bis zu einer Konzentration von $4\mu\text{g/ml}$ blieb die typische Fibroblastenform (Abb. 10 - 12) erhalten. Als Konzentration für meine Markierungsversuche mit Leucin wählte ich die von Nass (1970) sowie Richert und Hare (1972) benutzte Konzentration von $1\mu\text{g EB/ml Medium}$.

Abb. 10 - 12: Vergrößerungsreihe von Hühnerembryofibroblasten in einer Monolayer-Kultur

Die Zellen sind länglich mit spitz ausgezogenen Enden, etwa $100\mu\text{m}$ lang und $15\mu\text{m}$ breit. Diese längliche Form zeigen nur gesunde Zellen; bei jeder Schädigung - etwa durch höhere Konzentrationen von EB oder durch Behandlung mit Trypsin - ziehen die Zellen ihre Ausläufer ein und nehmen eine runde Form an.

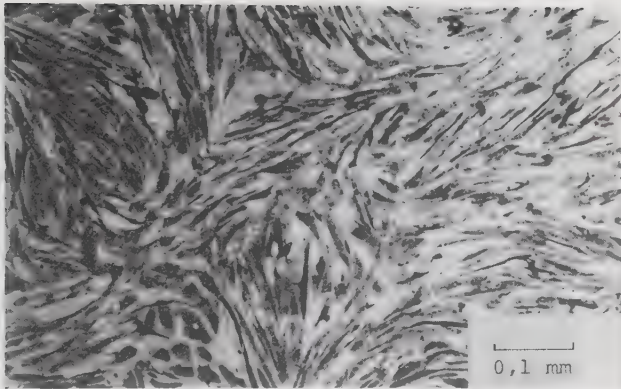


Abb. 10: Hühnerembryofibroblasten in Monolayer-Kultur

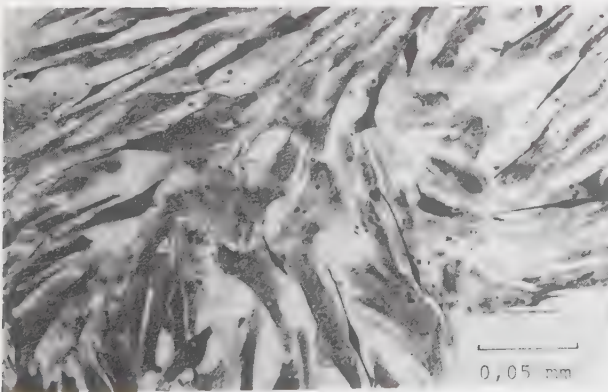


Abb. 11: Ausschnittvergrößerung aus Abb. 10

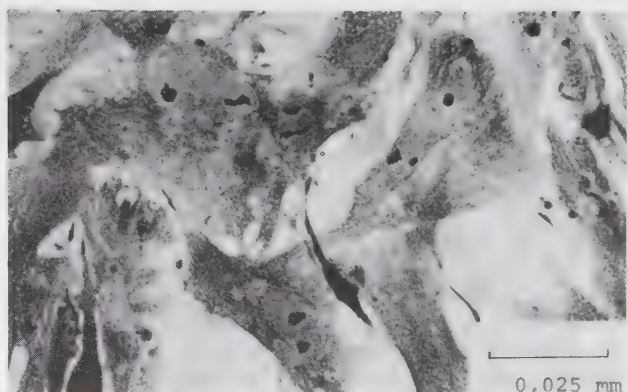


Abb. 12: Ausschnittvergrößerung aus Abb. 11

3.3. Bestimmung der zur Transformation nötigen Konzentration an Rous-Sarkom-Virus

Die Konzentration der RSV bestimmte ich - wie unter 2.3. beschrieben - durch Messen der Aktivität der Reverse Transcriptase, die in IpM angegeben werden kann. Um die zur Transformation nötige Konzentration der Reverse Transcriptase in IpM/ml zu ermitteln, wurden in sechs Plastikgefäße (Wachstumsfläche 75 cm^2) HEF in gleicher Konzentration eingesät. Dazu wurden steigende Konzentrationen von RSV-Suspensionen gegeben. Die einzelnen Konzentrationen, bestimmt durch Messung der Aktivität der umgekehrten Transcriptase, waren:

1	1250 IpM/ml
2	2500 IpM/ml
3	5000 IpM/ml
4	10000 IpM/ml
5	17000 IpM/ml

Nach mehrfachem Mediumwechsel in 48-stündigen Abständen wurde bei erneutem Mediumwechsel das verbrauchte Medium bei -70° eingefroren und später davon das 100 000 x g Sediment abzentrifugiert. Dieses Sediment wurde dann auf seine Reverse-Transcriptase-Aktivität getestet. Dabei wurde der Einbau an ^3H bei der Konzentration

- 1 mit etwa 20000 IpM
 - 2 mit etwa 30000 IpM
 - 3 mit etwa 38000 IpM
 - 4 mit etwa 29000 IpM
 - 5 mit etwa 19000 IpM
- gemessen.

In allen Gefäßen wurden also Zellen transformiert. Die höchste Transformationsrate konnte aber bei einer Viruskonzentration erreicht werden, die einer Aktivität der Reverse Transcriptase von 5000 IpM/ml entspricht. Darunter ist die Konzentration wahrscheinlich zu niedrig, während darüber möglicherweise ein cytotoxischer Effekt auftritt. Ich verwendete für meine Versuche deshalb eine Viruskonzentration, die eine Reverse-Transcriptase-Aktivität von 5000 - 10000 IpM/ml Medium ergab.

3.4. Einbau von ^3H - und ^{14}C - markiertem Leucin

3.4.1. in Hühnerembryofibroblasten in Gegenwart von Ethidiumbromid

Nach dem Ergebnissen von Nass (1970), Zylber et al. (1969) und Attardi & Attardi (1971) hemmt EB spezifisch die mitochondriale DNA-Synthese und ihre Transcription. Demnach dürfte EB auch die mitochondriale Proteinsynthese, vielleicht auch die Proteinsynthese in anderen subzellulären Fraktionen hemmen. Um dies festzustellen, inkubierte ich HEF in An- und Abwesenheit von EB mit radioaktiv-markiertem Leucin - wie unter 2.4. beschrieben - . Züchtet man Zellen in Gegenwart von radioaktiven Aminosäuren, so werden diese vorwiegend in Proteine eingebaut, die zu dieser Zeit in den Zellen synthetisiert werden. Dadurch können Proteine radioaktiv markiert werden, und der Gehalt der einzelnen subzellulären Fraktionen an Radioaktivität ist ein Maß für die Proteinneusynthese in diesen Zellfraktionen. Ich inkubierte die Zellen zunächst mit ^{14}C -markiertem Leucin, um ein Maß für die Proteinsynthese unter normalen Bedingungen zu erhalten. Die Kontrollzellen wurden dann ohne, die Testzellen mit EB inkubiert; anschließend wurden die unter diesen Bedingungen synthetisierten Proteine durch Zugabe von ^3H -Leucin etikettiert. Wenn EB keinen Einfluß auf die Proteinsynthese ausübt, dann sollte das Verhältnis der Nachmarkierung zur Vormarkierung in den Kontroll- und den Testzellen gleich sein. Dieses Verhältnis entspricht dem Quotienten aus

den ^3H -Impulsen zu den ^{14}C -Impulsen pro Minute. Wenn EB die Proteinsynthese in einzelnen subzellulären Fraktionen hemmt, müßte der Quotient $^3\text{H}\text{-IpM}/^{14}\text{C}\text{-IpM}$ dieser Fraktion bei den Testzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen abnehmen. In den Abbildungen 13 - 23 wurde jeweils der Quotient der Kontrollzellen als 100 Prozent angesetzt, der Quotient der Testzellen wurde dann in Abhängigkeit von der Zeit des jeweiligen Versuchs dargestellt.

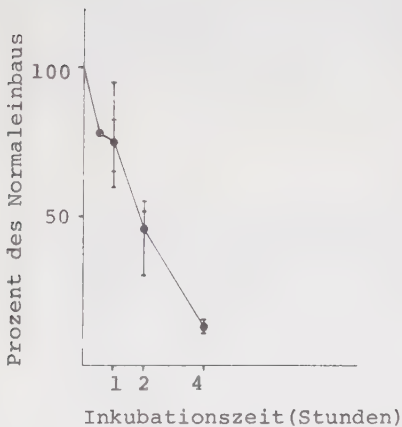


Abb. 13: Einfluß von EB auf die Proteine in der Fraktion der rohen Kerne. EB hemmt die Synthese der Proteine, die in der rohen Kern-Fraktion zu finden sind, sehr stark. Bei geringer Streuung der Werte fällt die Kurve gleichmäßig ab.

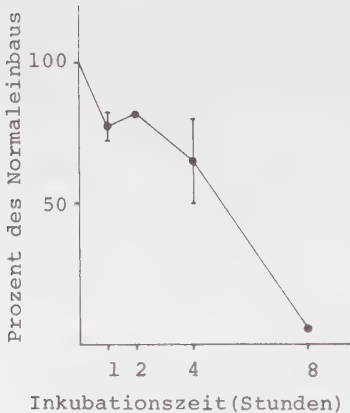


Abb. 14: Einfluß von EB auf die Proteine der reinen Kerne. Die Synthese der Proteine, die in der Fraktion der reinen Kerne gefunden werden, wird durch EB zunächst weniger stark gehemmt, fällt aber auch nach 8 Stunden auf 5% der Ausgangssynthese ab. Der leichte Anstieg der Kurve bei 2 Stunden dürfte im Bereich der üblichen Streuung liegen; hier konnte nur 1 Wert bestimmt werden.

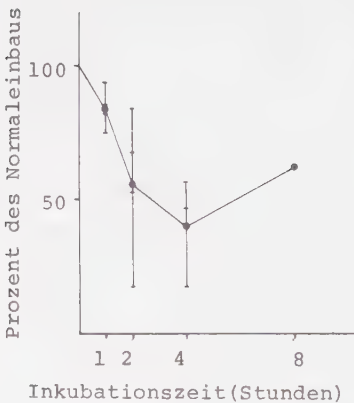


Abb. 15: Einfluß von EB auf die Synthese der Mitochondrienproteine. Hier zeigt sich ein uneinheitlicher Kurvenverlauf. Während die Hemmung im Verlauf der ersten 4 Stunden relativ gleichmäßig auf 60% steigt, wird sie bei 8 Stunden mit etwa 40% wieder geringer. Auffällig ist allerdings auch die starke Streuung der Werte, insbesondere beim 2-Stunden-Wert.

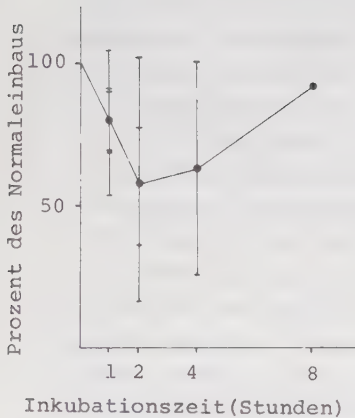


Abb. 16: Einfluß von EB auf die Synthese der Proteine der Mikrosomen-Fraktion. In den ersten beiden Stunden fällt die Kurve wie bei der Mitochondrien-Fraktion auf etwa 60% ab, aber dann beginnt bereits der Wiederanstieg, der bei 8 Stunden wieder 90% erreicht. Die Streuung der Werte ist allerdings sehr hoch. Dies dürfte zum Teil auf die sehr geringe Menge des Proteins der Mikrosomen-Fraktion und damit auf die kleine Anzahl von IpM zurückzuführen sein.

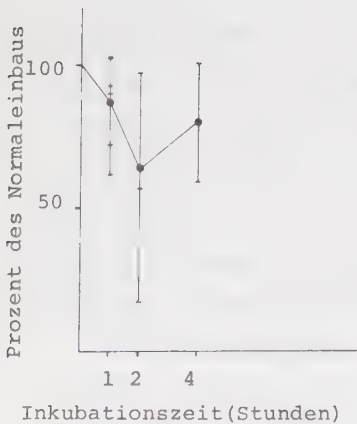


Abb. 17: Einfluß von EB auf die Synthese der cytosolischen Proteine. Die Hemmung der Proteinsynthese ist nicht sehr ausgeprägt, und die Kurve steigt - wie die der Mikrosomen-Fraktion - schon nach 2 Stunden wieder an. Allerdings zeigt sich auch hier, vor allem beim 2-Stunden-Wert, eine starke Streuung der Meßwerte.

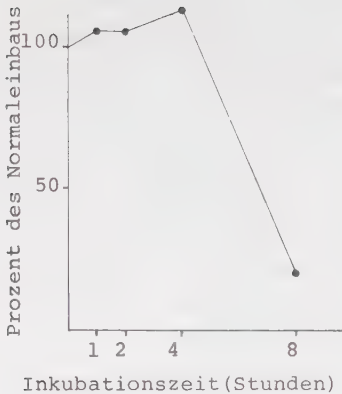


Abb. 18: Einfluß von EB auf die Synthese der Zellmembranproteine. Interessanterweise scheint EB hier zunächst die Proteinsynthese zu stimulieren, denn nach 4 Stunden ist die Proteinsynthese um 13% gestiegen. Danach kommt es im Gegensatz zu den Fraktionen der Mitochondrien, Mikrosomen und des Cytosols zu einem steilen Abfall der Kurve auf 20% der normalen Proteinsynthese. Die Zellmembran-Fraktion wurde nur in wenigen Versuchen präpariert, sodaß keine Mehrfachmessungen bei einzelnen Zeitpunkten durchgeführt wurden.

Wie aus den Abbildungen 13 - 18 zu sehen ist, hemmt der Farbstoff Ethidiumbromid im Wesentlichen die Synthese der Kern- und Mitochondrienproteine. Der Einfluß von EB auf die Proteinsynthese in den anderen subzellulären Fraktionen ist weniger ausgeprägt. Bei einigen Versuchen zeigte es sich, daß die Synthese der Proteine der Zellmembranen, der Mikrosomen-Fraktion und des Cytosols durch EB nicht beeinflusst werden. In anderen Versuchen war indes die Hemmung der Eiweißsynthese in diesen Fraktionen deutlich zu erkennen. Diese relativ breite Streuung dürfte auf den unterschiedlichen Wachstumszustand der HEF

zurückzuführen sein. Denn auch bei optisch gleicher Dichte des Zellrasens kann eine wechselnde Anzahl von Zellen sich noch in der logarithmischen Phase, eine andere in der stationären Phase befinden. Damit ließe sich die unterschiedliche Einbaurrate von ^3H -Leucin erklären.

3.4.2. (Einbau von ^3H - und ^{14}C -markiertem Leucin) in Hühner-embryofibroblasten während der Transformation mit Rous-Sarkom-Viren mit und ohne Zusatz von Ethidiumbromid

Analog zu den vorhergehenden Versuchen wurden HEF vor der Transformation mit ^{14}C -markiertem Leucin inkubiert und damit ihre Proteine etikettiert. Einige Zeit nach Beginn der Transformation wurde ^3H -Leucin in die zu dieser Zeit in den Zellen synthetisierten Proteine eingebaut, wobei die eine Hälfte der Zellen während der Transformation mit, die andere ohne EB inkubiert wurde. Wieder wurde der Quotient aus den ^3H -IpM und den ^{14}C -IpM bei den einzelnen subzellulären Fraktionen der Kontrollzellen als 100 Prozent angesetzt und mit dem Quotienten der entsprechenden Fraktion bei den Testzellen verglichen. Die folgenden Abbildungen (19 - 23) zeigen die Änderung des Quotienten und damit der Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Zeit, die zwischen dem Beginn der Transformation und der Nachmarkierung verstrich.

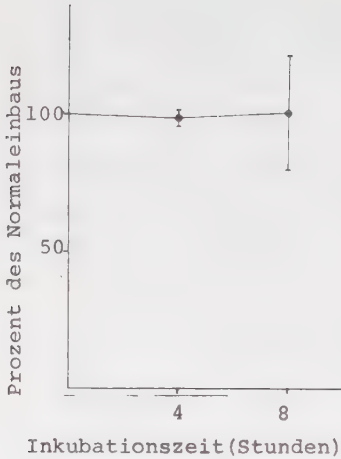


Abb. 19: Einfluß von EB auf die Synthese der später in der Kernfraktion gefundenen Proteine von HEF während der Transformation mit RSV. EB scheint unter diesen Bedingungen die Proteinsynthese hier nicht zu beeinflussen. Die Streuung der Werte ist relativ gering.

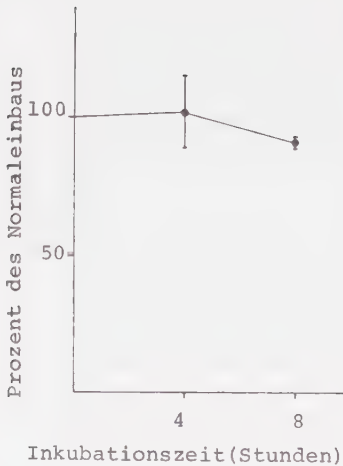


Abb. 20: Einfluß von EB auf die Synthese der Mitochondrienproteine von HEF während der Transformation mit RSV. Ein Hemmeffekt von EB auf den Leucineinbau ist erkennbar, beginnt aber erst nach 4 Stunden und erreicht einen Wert von 9%.

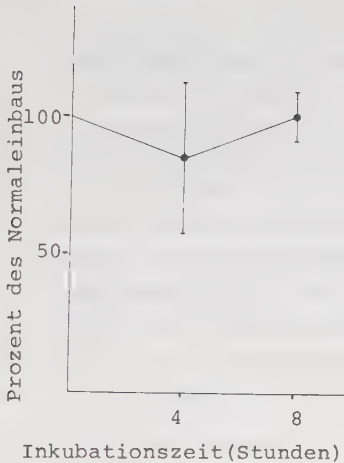


Abb. 21: Einfluß von EB auf die Synthese der mikrosomalen Proteine von HEF während der Transformation mit RSV. Hier zeigt sich - ebenso wie bei der Inkubation normaler HEF mit EB - bei Anwesenheit von EB während der Transformation nach 4 Stunden ein Abfall der Kurve, die aber nach 8 Stunden mit 101% wieder den Ausgangspunkt erreicht.

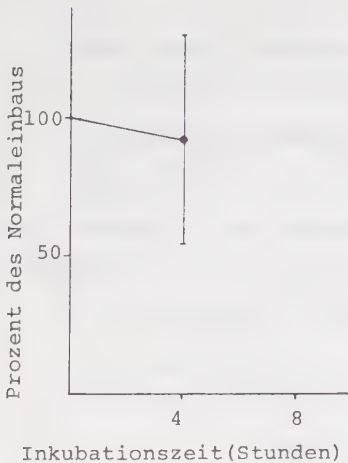


Abb. 22: Einfluß von EB auf die Synthese der cytosolischen Proteine von HEF während der Transformation mit RSV. Aus dem Cytosol konnte beim 8 Stunden-Versuch mit 15% TCA kein Protein ausgefällt werden; daher wurde nur der 4 Stunden-Wert aufgezeichnet. Die starke Streuung dieses Wertes läßt eine Aussage über den Einfluß von EB unter diesen Bedingungen nicht zu.

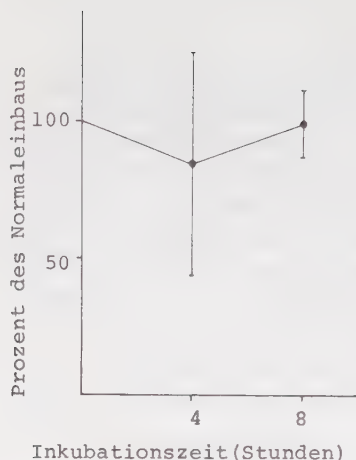


Abb. 23: Einfluß von EB auf die Synthese der Zellmembranproteine von HEF während der Transformation mit RSV. Das Bild ähnelt hier dem der Mikrosomen-Fraktion: Es kommt auch hier zunächst zu einem Abfall der Proteinsynthese, die nach 8 Stunden mit 99% wieder ihren Ausgangswert erreicht. Auch hier ist die Streuung beim 4 Stunden-Wert hoch.

Bemerkenswert an den Ergebnissen dieser Versuchsreihe, wie sie an den Abbildungen 19 - 23 abzulesen sind, ist der Befund, daß der Farbstoff EB während der Transformation von HEF mit RSV die Synthese der gesamten Kern- und Mitochondrienproteine - gemessen am Leucineinbau - im Gegensatz zu nicht-transformierten HEF nicht hemmt. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß in den transformierten Zellen durch die Wirkung der Viren andere Transcriptions- und Translationsmechanismen in Erscheinung treten, auf die EB keinen Einfluß hat, und die in normalen Zellen entweder fehlen oder reprimiert sind. Hinweise dafür wären episodale Faktoren und das Auftreten von Ribosomen, an denen nur virus-spezifische Messenger-RNA zu virus-spezifischen Proteinen translatiert wird (Silvestri, 1973).

3.4.3. (Einbau von ^3H - und ^{14}C -markiertem Leucin) in nicht-transformierte Hühnerembryofibroblasten im Vergleich mit Rous-Sarkom-Virus-transformierten Hühnerembryofibroblasten mit und ohne Zusatz von Ethidiumbromid

In einem größeren Versuch wurden die Zellen im Unterschied zu der Versuchsdurchführung, wie sie unter 2.4. beschrieben ist, nicht nur in Kontroll- und Testzellen geteilt, sondern die Testzellen selbst wurden nochmals geteilt. Die Kontrollzellen wurden nach der Vormarkierung mit ^{14}C -Leucin in normalem Medium inkubiert, die erste Hälfte der Testzellen wurde zusammen mit RSV inkubiert, die zweite mit RSV in Gegenwart von EB. Nach 4 Stunden wurden die zu diesem Zeitpunkt synthetisierten Proteine - wie in 2.4. beschrieben - mit ^3H -markiertem Leucin radioaktiv etikettiert. Verglichen wurde wieder der Quotient aus den ^3H - und ^{14}C - IpM der einzelnen subzellulären Fraktionen der drei unter verschiedenen Bedingungen inkubierten Zellsuspensionen. Der Quotient der Kontrollzellen wurde auch diesmal als 100 Prozent angesetzt. Die folgenden Abbildungen (24 - 28) zeigen die Änderung des Quotienten unter den verschiedenen Bedingungen, also die Änderung des Leucineinbaus und damit der Proteinsynthese.

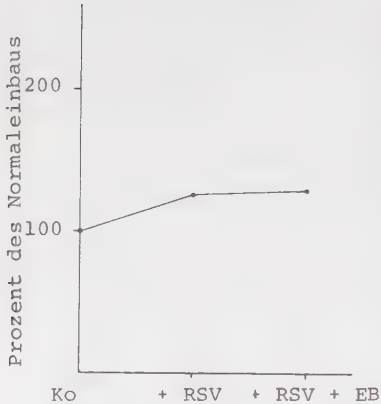


Abb. 24: Änderung des Leucineinbaus in die Proteine, die später in der Kern-Fraktion gefunden werden, während der Transformation in An- und Abwesenheit von EB. Die Proteinsynthese nimmt bei der Transformation um 26% zu. Dies ist zu erwarten, weil Tumorzellen auch eine Steigerung des anabolen Stoffwechsels gegenüber normalen Zellen erfahren. EB zeigt keinen Einfluß auf diese Erhöhung der Proteinsynthese.

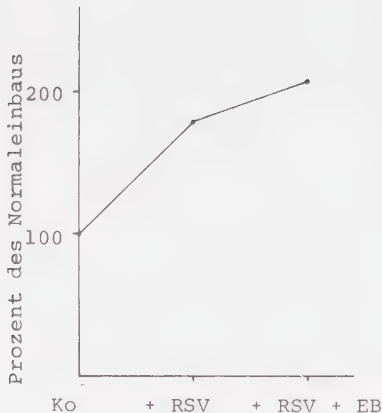


Abb. 25: Änderung des Leucineinbaus in die Proteine der Mitochondrien während der Transformation in An- und Abwesenheit von EB. Die Proteinsynthese wird hier während der Transformation erheblich stärker gesteigert als in den Kernen. Bei Zugabe von EB kommt es zu einer weiteren Steigerung des Leucineinbaus von 181% auf 208%.

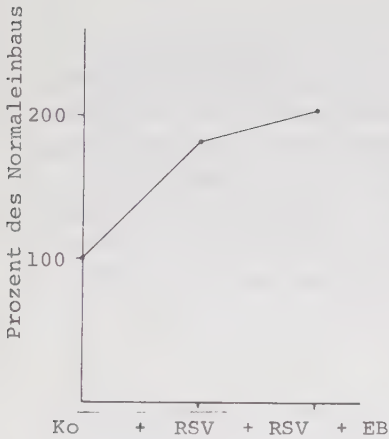


Abb. 26: Änderung des Leucineinbaus in die Proteine der Mikrosomen-Fraktion während der Transformation in An- und Abwesenheit von EB. Das Bild entspricht dem bei der Mitochondrien-Fraktion: Auch hier kommt es zu einer erheblichen Steigerung des Leucineinbaus während der Transformation, die unter dem Einfluß von EB auch noch zunimmt.

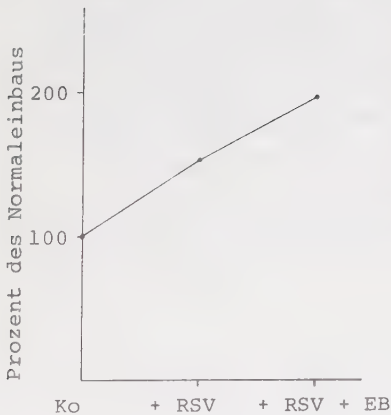


Abb. 27: Änderung des Leucineinbaus in die Proteine des Cytosols während der Transformation in An- und Abwesenheit von EB. Während der Transformation nimmt der Leucineinbau um 53% zu, die Zugabe von EB steigert ihn noch weiter auf 199%.

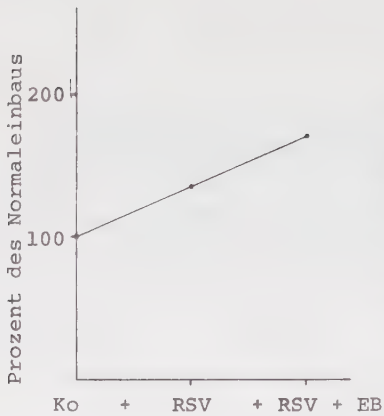


Abb. 28: Änderung des Leucineinbaus in die Proteine der Zellmembran-Fraktion während der Transformation in An- und Abwesenheit von EB. Auch hier wird die Steigerung des Leucineinbaus während der Transformation durch Zugabe von EB noch weiter verstärkt.

Aus den Abbildungen 24 - 28 erkennt man, daß der Leucineinbau und damit die Proteinsynthese während der Transformation in allen subzellulären Fraktionen gesteigert wird; die Anwesenheit von EB während der Transformation führt bei den Fraktionen der Mitochondrien, der Mikrosomen, des Cytosols und der Zellmembranen noch zu einer weiteren Steigerung des Leucineinbaus. Dieses Phänomen könnte möglicherweise geklärt werden, wenn nicht nur das gesamte Protein einer subzellulären Fraktion, sondern die einzelnen Proteine untersucht werden. Die Auftrennung des Gesamtproteins in die einzelnen Eiweiße gelingt am einfachsten mit Hilfe der PAA-Gel-Elektrophorese.

3.5. Proteinelektrophorese der subzellulären Fraktionen

3.5.1. Vergleich des Proteinmusters nach Anfärben der Gele mit Coomassie-Blau und nach Radioaktivitätsmessung

Um einen Vergleich der Trennschärfe der Elektrophoreseauswertung anzustellen zwischen der üblichen Anfärbung mit Coomassie-Blau und der Radioaktivitätsmessung nach Gelfraktionierung, wurden in einem Versuch die Zellproteine nur mit ^3H -Leucin markiert. Anschließend wurden die Zellen sofort fraktioniert, und die Proteine der Zellmembran-Fraktion nach dem Ausfällen mit einer Rundgelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde zunächst mit Coomassie-Blau gefärbt, wie unter 2.9. beschrieben ist, und bei 575 nm densitometriert. Danach wurde das Rundgel wieder in das Glasröhrchen eingeführt und im Gilson-Gelfractionator in Abständen von 1 mm geteilt und zerkleinert. Die Zahl der IpM jeder einzelnen Gelfraktion wurde gemessen und graphisch dargestellt. In der Abbildung 29 ist diese Kurve zusammen mit dem Densitogramm dargestellt.

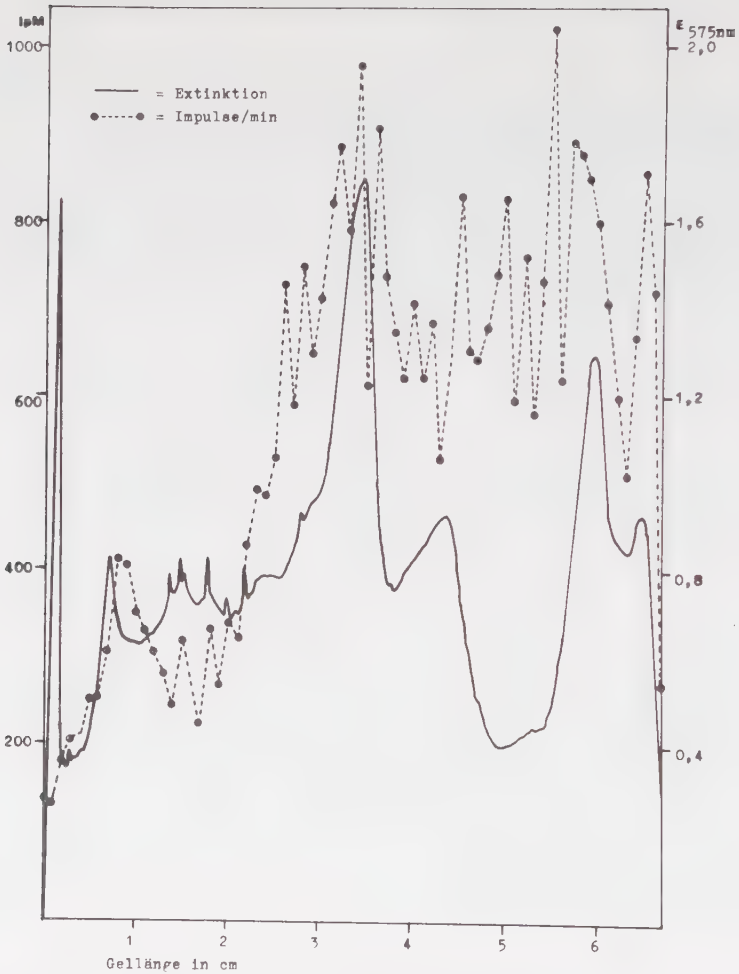


Abb. 29: Elektrophorese der Zellmembranproteine. Vergleich zwischen dem Densitogramm und der Radioaktivitätsmessung nach Gelfraktionierung. An der Anzahl der Proteinbanden erkennt man das bessere Auftrennungsvermögen bei der Auswertung mit Radioaktivitätsmessung.

An der Abbildung 29 erkennt man zwei Tatsachen:

1. Viele nebeneinander liegende Banden, die im Densitogramm nach Coomassie-Blau-Färbung ineinander verschmelzen, können nach der Markierung mit ^3H -Leucin klar voneinander abgegrenzt werden.
2. Die Intensität der Anfärbung mit Coomassie-Blau stimmt mit der Intensität der radioaktiven Strahlung der einzelnen Proteinbanden nicht überein. Demnach lassen sich zwischen den beiden Methoden keine Korrelationen bezüglich der Quantität der einzelnen Proteinbanden ableiten. Die Anfärbung der Proteine mit Coomassie-Blau beruht nach Maurer (1968) vorwiegend auf elektrostatischen und apolaren Wechselwirkungen und nicht auf kovalenten Bindungen. Dadurch färben sich Proteine mit mehr polaren Aminosäuren stärker an als solche, die vor allem apolare Aminosäuren enthalten. So gibt es auch Proteine, die sich mit Coomassie-Blau überhaupt nicht anfärben lassen. Bei der Markierung mit radioaktivem Leucin bauen die Proteine Radioaktivität entsprechend ihrem Gehalt an Leucin und ihrem "Turnover" ein.

Zur Ermittlung der Proteinzusammensetzung der einzelnen subzellulären Fraktionen habe ich mich aus folgenden Gründen für die Radioaktivitätsmessung nach Gel-Fraktionierung entschieden:

1. Die Trennschärfe der einzelnen Proteinbanden ist wesentlich höher, weil bei der Anfärbung mit Coomassie-Blau neben den schon erwähnten Bindungsphänomenen zwischen eng beieinander

liegenden Banden ein erhöhter Farbstoffuntergrund bleibt.

2. Der Nachteil, daß sich verschiedene Proteinbanden nicht entsprechend ihrer Quantität, sondern ihrem Leucin-Gehalt darstellen, kann weitgehend ausgeschaltet werden. Denn die zu vergleichenden Kurven wurden immer nach derselben Methode, also Einbau von radioaktiv-markiertem Leucin, Gelelektrophorese, Gel-Fraktionierung und Radioaktivitätsmessung, untersucht. Die Unterschiede im Elektrophoresemuster sind daher ein Maß für die veränderte Syntheserate der einzelnen Proteinbanden.
3. Die Markierung der Proteine mit radioaktivem Leucin erlaubt eine Aussage über die zu dieser Zeit in der Zelle synthetisierten Proteine. Dies war für meine Versuche deshalb von Bedeutung, weil die bei der Transformation entstehenden Proteine sehr wahrscheinlich nur einen Bruchteil der gesamten zellulären Proteine darstellen; zum Zeitpunkt ihrer Synthese jedoch können sie möglicherweise genügend hoch markiert werden, um sie auf diese Weise von der Masse der anderen Proteine zu unterscheiden.

3.5.2. Vergleich der Markierungsmuster zwischen normalen und in Gegenwart von Ethidiumbromid inkubierten Hühnerembryofibroblasten

Das Gesamtprotein der einzelnen subzellulären Fraktionen aus dem Versuch, der unter 3.4.1. beschrieben ist, wurde nun mit einer PAA-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Die einzelnen Gele

wurden fraktioniert, und die Fraktionen dann auf ihren Gehalt auf ^3H und ^{14}C untersucht. Die einzelnen Werte und der Quotient aus beiden wurden in Kurven eingezeichnet, die in den Abbildungen 30 - 35 zu sehen sind.

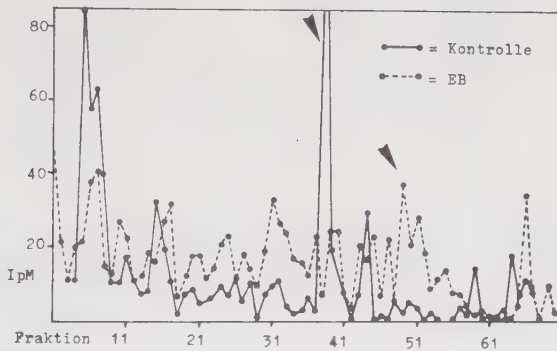


Abb. 30: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine der Kern-Fraktion zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB. Wegen des geringen Einbaus an ^{14}C -Leucin wurde nur die Kurve der ^3H -IpM dargestellt. Das Muster läßt erkennen, daß die Kerne eine Vielzahl von Proteinen enthalten, deren Syntheserate sich stark voneinander unterscheidet. Bei einigen dieser Proteine (▼) hat EB einen Effekt auf die Bildung bzw. auf die Geschwindigkeit ihrer Produktion, die einmal verstärkt und einmal vermindert ist. Die methodischen Schwierigkeiten, die bei der Gel-Fraktionierung auftraten und kleinere Abweichungen im Elektrophoresemuster bei ein und derselben subzellulären Fraktion erklären, sollen in der Diskussion erörtert werden.

Abb. 31: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine der Mitochondrien-Fraktion zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB. Während die Kurven der ^{14}C -IpM (= Vormarkierung) relativ gleich sind, finden sich bei den ^3H -Kurven einige Unterschiede, die sich auch bei den Darstellungen der Quotienten wieder zeigen (▼). Diese meist quantitativen Unterschiede lassen sich mit den methodischen Schwierigkeiten der Gelfraktionierung erklären.

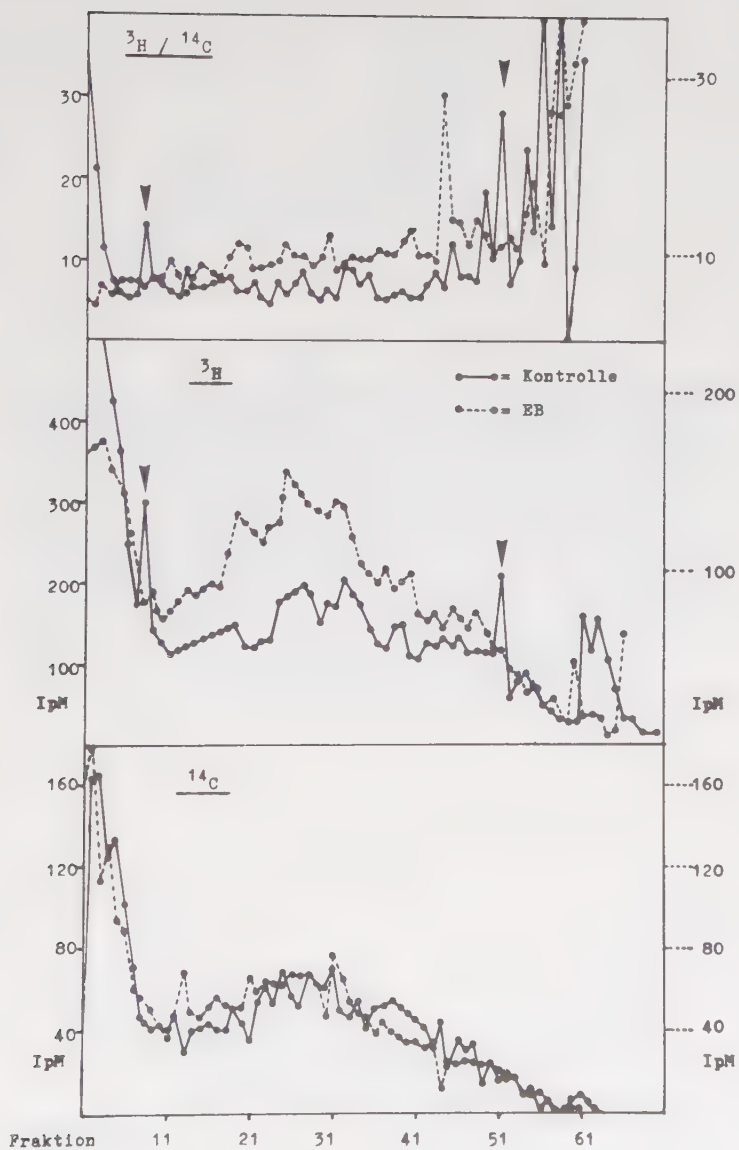


Abb. 32: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine der Mikrosomen-Fraktion zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB. Hier zeigt sich besonders bei der Darstellung der Quotienten eine gute Übereinstimmung zwischen den beiden Kurven. An zwei Stellen (▼) erkennt man deutlich, daß zwei bzw. drei Gipfelpunkte der Kurve der Kontrollzellen zu einem einzigen - dafür aber wesentlich höheren - in der Kurve der Testzellen verschmolzen sind. Derartige Verschmelzungen treten nach Gelfraktionierung relativ häufig auf.

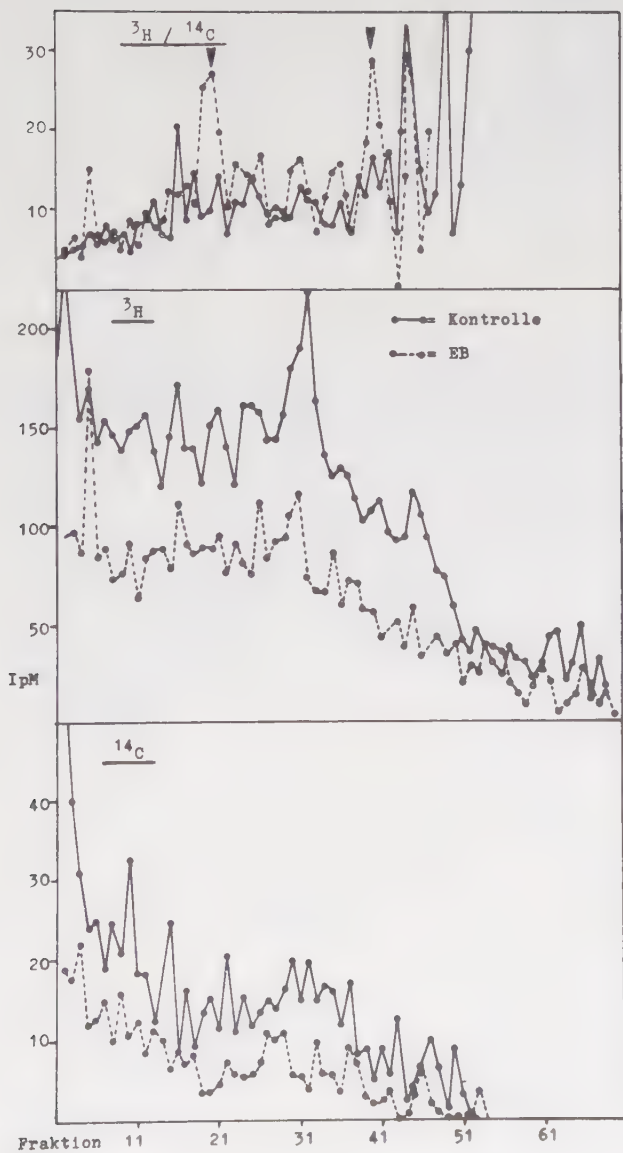


Abb. 33: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine im Cytosol zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB. Bei der Kurve der ^3H -IpM - also der Nachmarkierung - stimmen die beiden verschiedenen Cytosol-Protein-Gemische weitgehend überein. Der einzige quantitative Unterschied (▼) zeigt sich auch bei der Darstellung der Quotienten. Dieser auffallende Unterschied ließ sich bei Wiederholungen des Versuchs aber nicht mehr reproduzieren, sodaß auch er Folge des methodischen Fehlers bei der Gel-Fraktionierung sein dürfte.

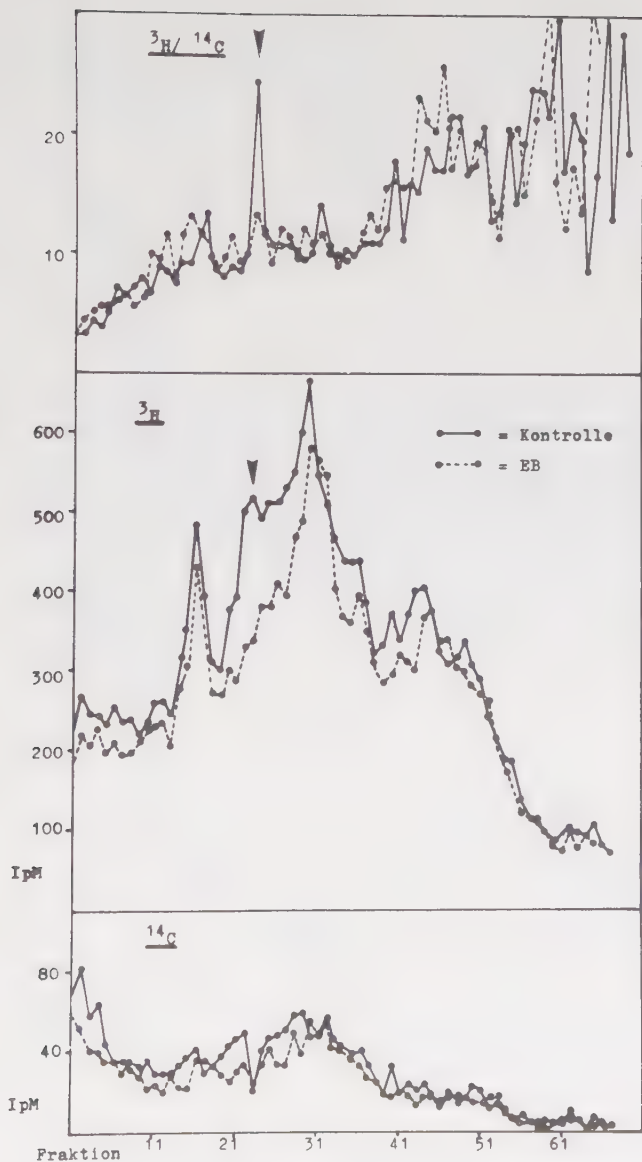


Abb. 34: Vergleich der Elektrophoresemuster der Zellmembranproteine zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB nach 4 Stunden Inkubation. Bis auf eine Proteinbande (▼), die allerdings auch schon die Kurven der ^{14}C -IpM voneinander unterscheidet, zeigen sich bei der ^3H - und Quotienten-Kurve lediglich seitliche Verschiebungen der einzelnen Banden, die wahrscheinlich auf Gel-Fraktionierungseffekte zurückzuführen sind.

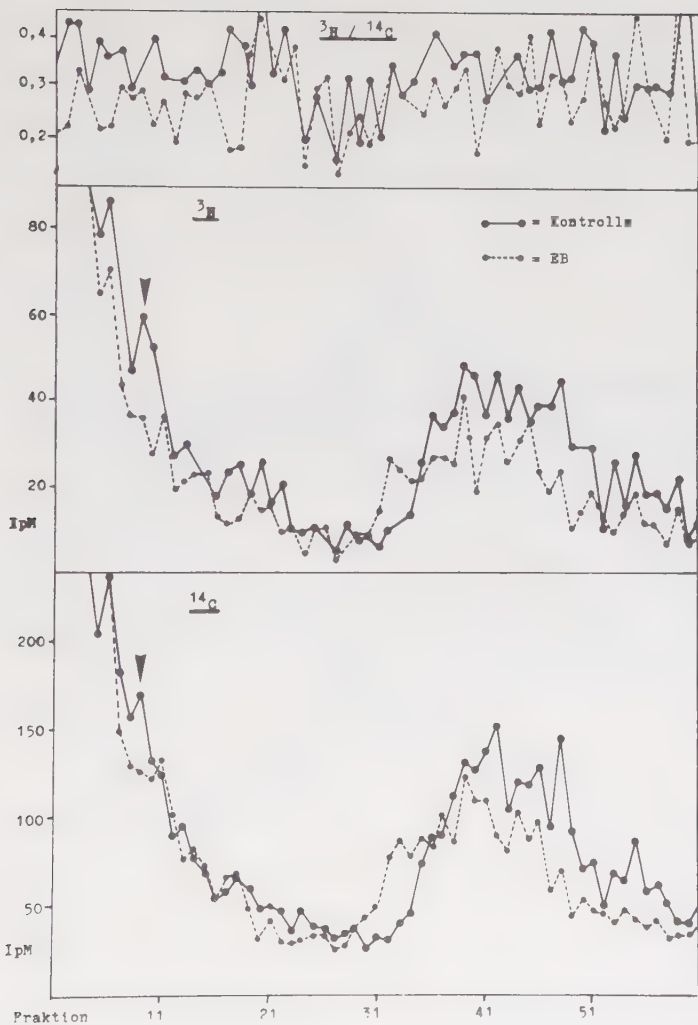
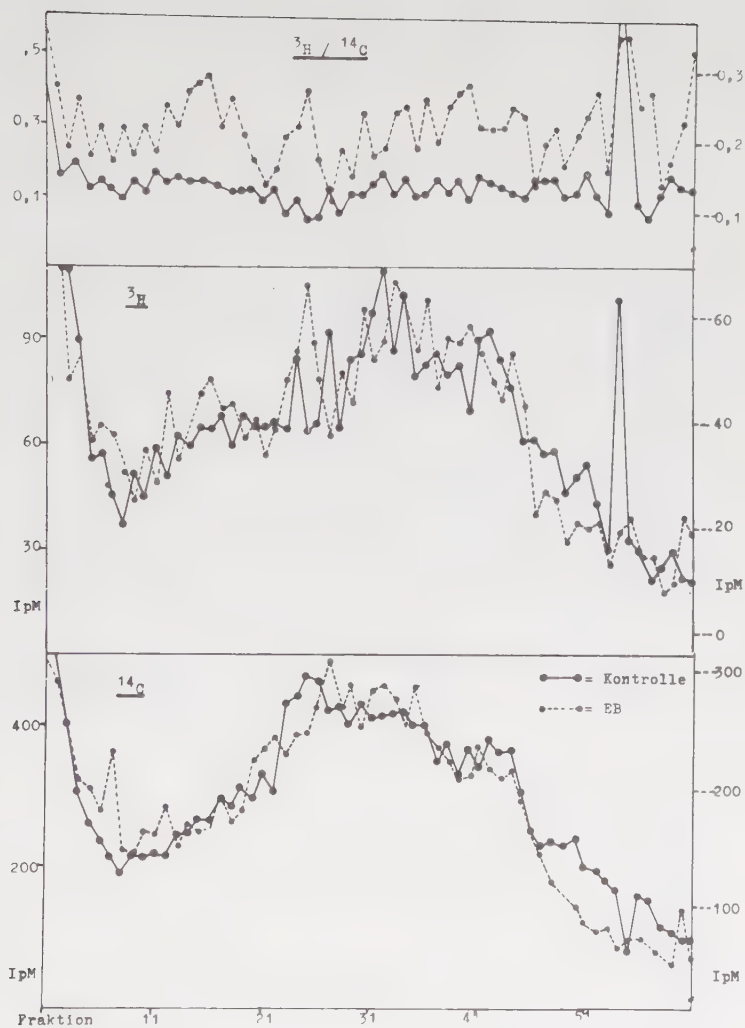


Abb. 35: Vergleich der Elektrophoresemuster der Zellmembranproteine zwischen normalen HEF und HEF in Gegenwart von EB nach 8 Stunden Inkubation. Die Kurven der ^{14}C -IpM sind weitgehend ähnlich und zeigen keine besonders scharfe Abgrenzung der einzelnen Proteinbanden. Diese Banden sind bei den ^3H -Kurven wesentlich schärfer voneinander abgegrenzt; aber auch hier zeigen sich nur wieder die üblichen Unterschiede: Verschmelzungen von mehreren Banden zu einer und seitliche Verschiebung von Banden.



3.5.3. Vergleich der Markierungsmuster normaler Hühnerembryo-fibroblasten und Hühnerembryofibroblasten während der Transformation mit Rous-Sarkom-Viren

Die von mir gesuchten während der Transformation neu synthetisierten Proteine sollten am Ort ihrer Synthese, also an freien oder membrangebundenen Ribosomen und somit in der Mikrosomen-Fraktion zu finden sein. Außerdem vermutete ich, sie in der Fraktion der Zellmembranen zu finden. Deshalb führte ich einen Markierungsversuch analog zu 2.4. durch, bei dem nach der Trennung der Zellen die Kontrollzellen in normalem Medium, die Testzellen aber zusammen mit einer RSV-Suspension inkubiert wurden. Nach der Zell-Fraktionierung trennte ich die Proteine der Mikrosomen-Fraktion und die Proteine der Zellmembran-Fraktion mit einer PAA-Gel-Elektrophorese auf. Abbildung 36 und 37 zeigen die graphische Darstellung der Auswertung dieser beiden Elektropherogramme.

Abb. 36: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine der Mikrosomen-Fraktion von normalen HEF und HEF während der Transformation mit RSV. Schon bei der Kurve der ^{14}C -IpM - also der Vormarkierung - findet sich eine weitgehende Übereinstimmung der beiden Proteingemische, obwohl die Zellen aus verschiedenen Versuchen stammen. Der einzig auffallende - nicht nur quantitative - Unterschied zeigt sich gleich zu Beginn der ^{14}C -Kurve (▼) . In der ^3H -Kurve - der Kurve der Nachmarkierung - ist die Übereinstimmung nicht so groß, aber die Kurven zeigen wieder große Ähnlichkeit. In der Kurve der Quotienten verschmelzen an mehreren Stellen wieder 2 Gipfelpunkte aus der einen Kurve zu einem einzigen größeren in der anderen Kurve (♠) . Gravierende Unterschiede im Kurvenverlauf, die auf eine Synthese neuer Proteine hinweisen, lassen sich nicht finden; die kleineren Unterschiede konnten bei Wiederholung der Elektrophorese nicht reproduziert werden.

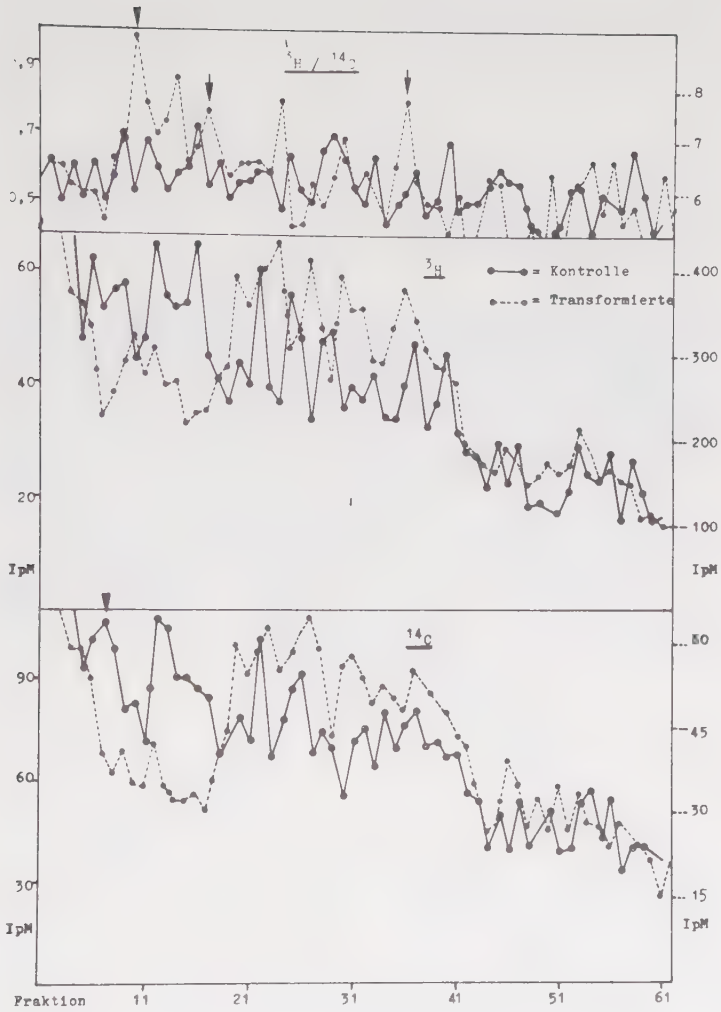
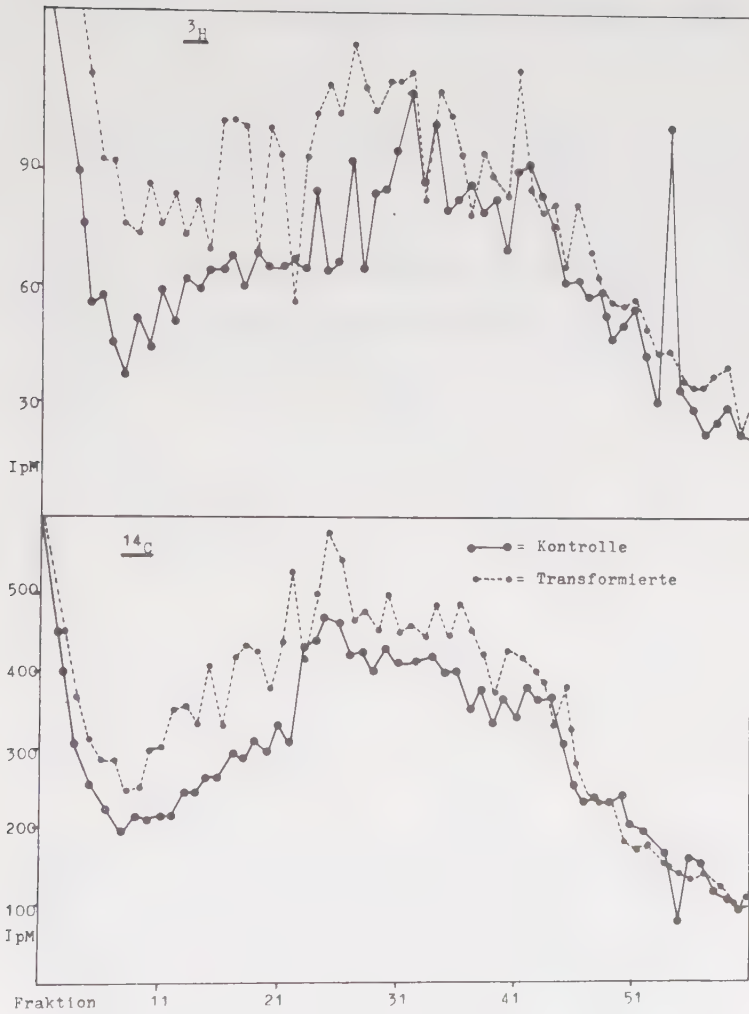


Abb. 37: Vergleich der Elektrophoresemuster der Proteine der Fraktion der Zellmembranen von normalen HEF und HEF während der Transformation mit RSV. Die Kurven der Vormarkierung mit ^{14}C stimmen gut überein, aber auch bei der Nachmarkierung mit ^3H zeigen sich nur geringfügige quantitative Unterschiede. Leider war die seitliche Verschiebung der Gipfelpunkte in den ^{14}C - und ^3H -Kurven so unterschiedlich, daß sich kein auch nur einigermaßen übereinstimmender Kurvenverlauf der beiden Quotienten ergab. Deshalb verzichtete ich hier auf eine Darstellung dieser Kurven.



3.5.4. Vergleich der Markierungsmuster der Zellmembran-Fraktion normaler, transformierter und in Gegenwart von Ethidiumbromid mit Virus infizierter Hühnerembryofibroblasten

Bei dem großen Versuch, der schon unter 3.4.3. beschrieben wurde, trennte ich die Proteine der Zellmembran-Fractionen der drei Zellsuspensionen elektrophoretisch auf. Wegen der geringen Substanzmenge der Mikrosomen-Fraktion mußte ich bei dieser auf eine weitere Untersuchung der Proteine mittels Elektrophorese verzichten.

Abb. 38: Elektropherogramm der Zellmembranproteine. Vergleich der ^{14}C -Markierung (Vormarkierung) zwischen normalen HEF und solchen während der Transformation in Gegenwart und Abwesenheit von EB. Zwischen den drei Kurven bestehen erhebliche Unterschiede, obwohl alle drei Zellsuspensionen zusammen, also vor ihrer Trennung voneinander, mit ^{14}C -Leucin markiert wurden.

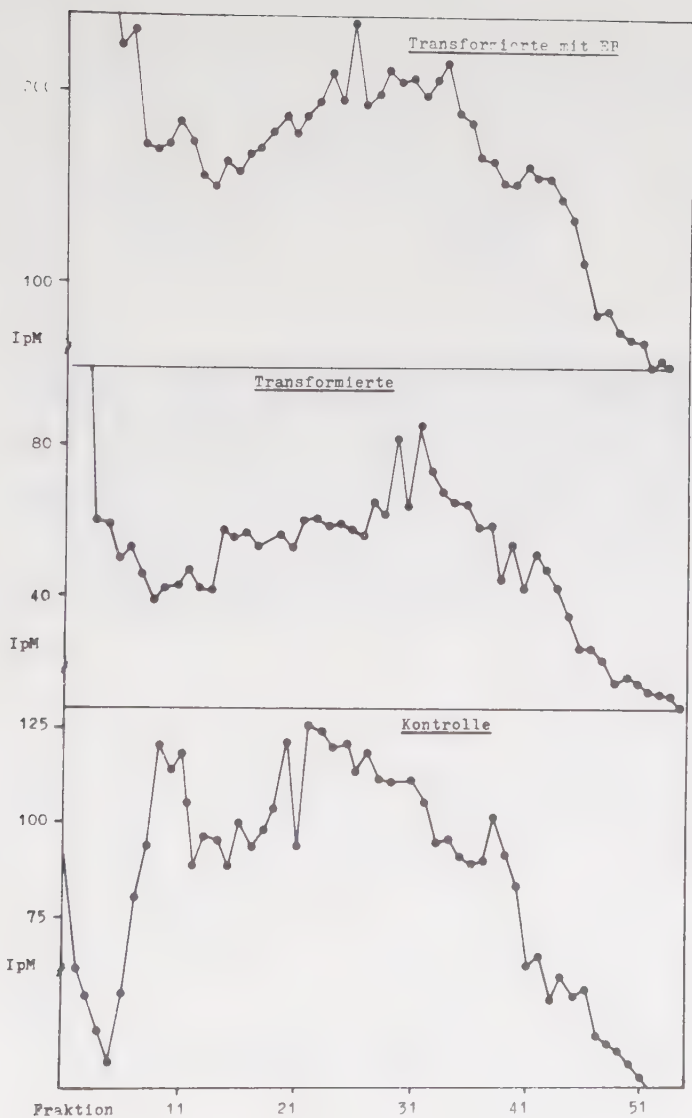
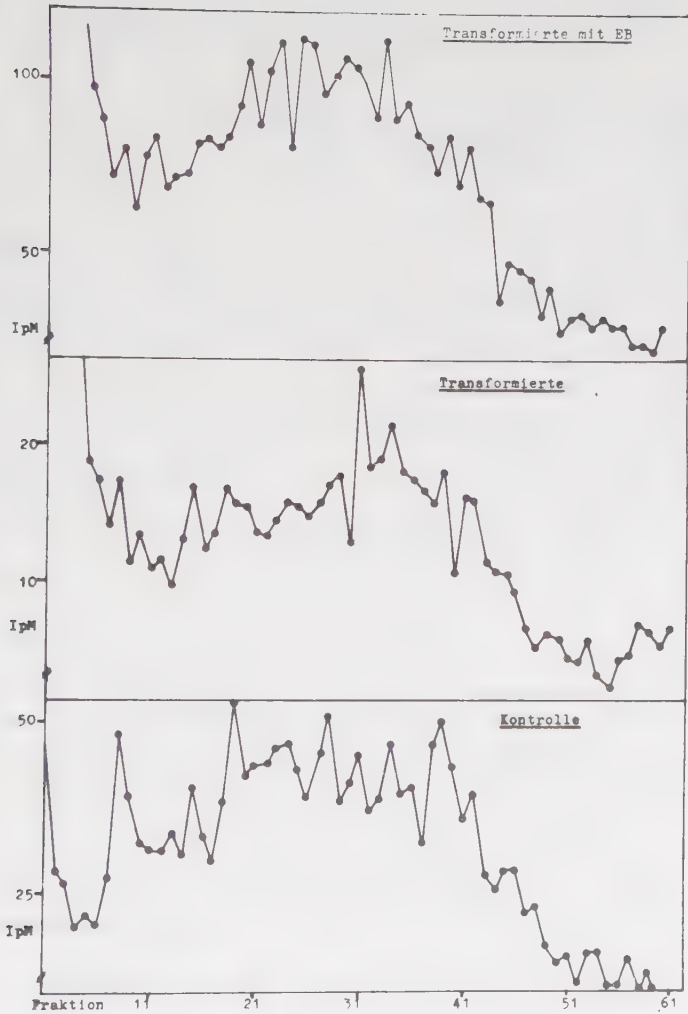


Abb. 39: Elektropherogramm der Zellmembranproteine. Vergleich der ^3H -Markierung (Nachmarkierung) zwischen normalen HEF und solchen während der Transformation in Gegenwart und Abwesenheit von EB. Wie nach dem Bild der Vormarkierung (Abb. 38) nicht anders zu erwarten war, zeigen auch hier die drei Kurven keine besonders gute Übereinstimmung, sodaß besondere Unterschiede, die auf neue Proteine hinweisen würden, nicht zu erkennen sind.



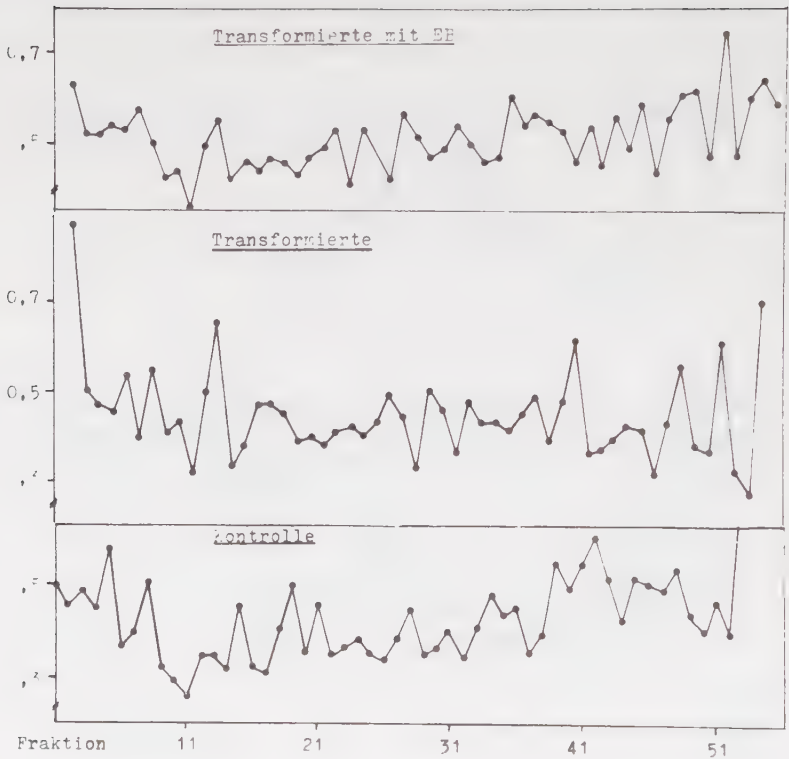


Abb. 40: Elektropherogramm der Zellmembranproteine. Vergleich der Quotienten $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ zwischen normalen HEF und solchen in Gegenwart und Abwesenheit von EB. Im Gegensatz zu den Kurven der ^3H - und der ^{14}C -Markierung lassen sich bei dieser Kurve wieder Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Zellen feststellen. Signifikante Unterschiede zwischen den Kurven, die Hinweise auf neu synthetisierte Proteine darstellen würden, lassen sich nicht finden. Die kleineren Unterschiede konnten bei Wiederholung des Versuchs nicht mehr reproduziert werden.

3.5.5. Vergleich der Markierungsmuster der aus der Zellmembran durch Trypsin abgelösten Proteine normaler, transformierter und in Gegenwart von Ethidiumbromid mit Virus infizierter Hühnerembryofibroblasten

Ich untersuchte nun noch die Proteine, die durch Trypsin-Behandlung intakter Zellen gewonnen werden können - wie unter 2.5. beschrieben ist - , um unter ihnen möglicherweise während der Transformation neu synthetisierte Proteine zu finden. Für diesen Versuch löste ich die Zellen nicht wie üblich mit Trypsin von der Wand der Rollerflaschen ab, sondern schabte sie mit einem sterilen Silikonschaber ab. Nach der Versuchsdurchführung - wie unter 2.4. beschrieben - wurden die Zellen der Trypsin-Behandlung unterzogen, und das gewonnene Protein wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele färbte ich mit Coomassie-Blau an und densitometrierte sie. Die Densitogramme dieser Elektrophorese zeigt die Abbildung 41. Anschließend wurden die densitometrierten Gele fraktioniert und in einem Flüssigkeitsszintillationszähler auf ihren Gehalt an Radioaktivität untersucht. Die Kurven der ^3H -IpM - also der Nachmarkierung - sind in Abbildung 42 dargestellt.

Abb. 41: Elektropherogramm der Zellmembranproteine, die von ganzen Zellen durch Trypsin abgelöst wurden. Vergleich zwischen normalen, transformierten und in Gegenwart von EB mit Virus infizierten Zellen. Densitogramme bei 575 nm nach Anfärben der Gele mit Coomassie-Blau. Die Nulllinie der drei Densitogramme wurde jeweils um einige cm nach oben verschoben, um eine bessere Übersicht zu erreichen. Die Kurve der Kontrollzellen zeigt zwei hohe Banden (1 und 2), von denen die 2. eine Schulter (3) aufweist. Die Bande 2 ist auch im Densitogramm der transformierten Zellen enthalten, während die Bande 1 zu einer Schulter in einer neuen Bande (4) verkleinert ist. Zwischen den Banden 4 und 2 im Densitogramm der transformierten Zellen erscheinen noch zwei weitere Banden (5 und 6). Die Bande 6 könnte der Schulter 3 in der Kurve der normalen Zellen entsprechen, allerdings ist sie viel stärker ausgeprägt. Im Densitogramm der in Gegenwart von EB transformierten Zellen reduziert sich die Bande 4 bis zum Niveau der Bande 1, sodaß ein Plateau entsteht. Ebenso erscheint die Bande 6 nur noch als Schulter der Bande 2.

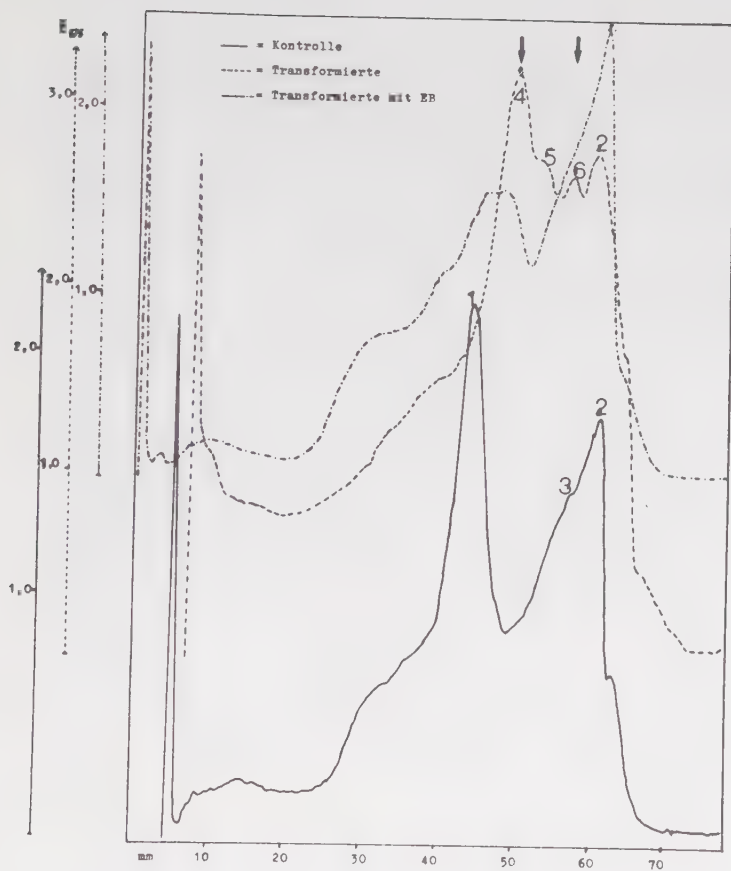
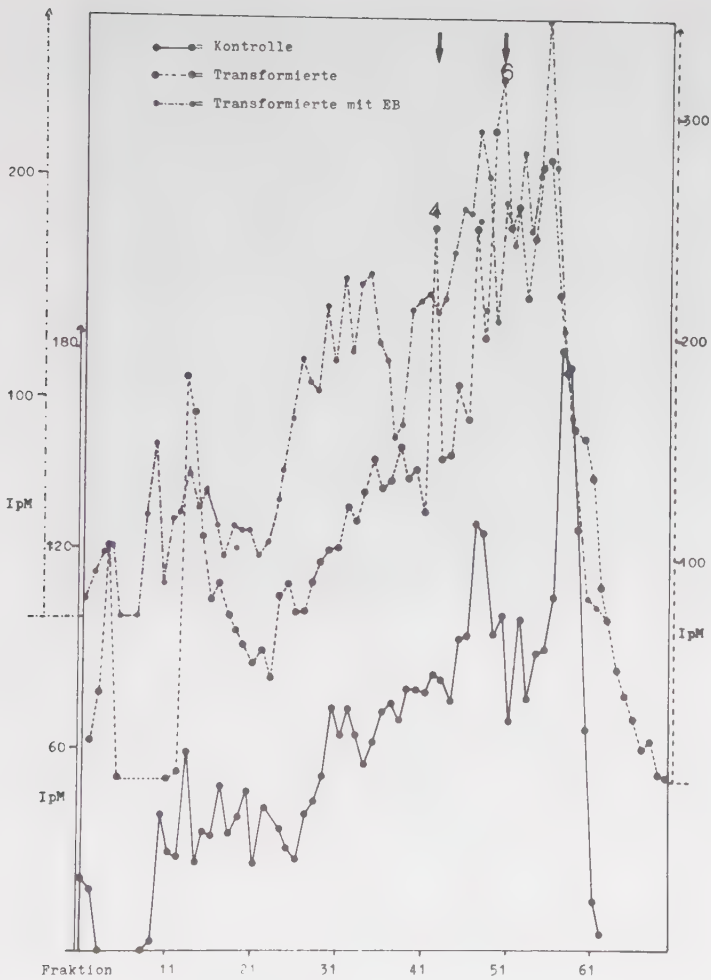


Abb. 42: Elektropherogramm der Zellmembranproteine, die von ganzen Zellen durch Trypsin abgelöst wurden. Vergleich zwischen normalen, transformierten und in Gegenwart von EB mit Virus infizierten Zellen. Zählung der ^3H -IpM (Nachmarkierung). Im Vergleich mit der Abbildung 41 erkennt man, daß die dort deutlich erkennbare Bande 1 nicht radioaktiv markiert ist. Es dürfte sich also bei ihr um Trypsin, den Trypsininhibitor oder einen Komplex aus beiden handeln. Die Bande 4 erscheint ausschließlich in der Kurve der transformierten Zellen, während die Bande 6 in dieser Kurve den höchsten Gipfelpunkt bildet und in den beiden anderen Kurven nur als kleiner Ausschlag erscheint.

Der Übersicht wegen sind die drei Etikettierungsmuster (Kontrolle, transformierte, transformierte mit EB) versetzt gezeichnet, wie es auch aus den verschiedenen Ordinaten deutlich wird.



Aus den Abbildungen 41 und 42 geht also hervor, daß unter den abtrypsinierten Proteinen ganzer Zellen nach der Transformation zwei zu finden sind, die in der entsprechenden Fraktion von normalen HEF fehlen. In Gegenwart von EB werden diese beiden Proteine während der Transformation nicht mehr synthetisiert, bzw. ihre Synthese wird stark gehemmt. Mit Hilfe von Vergleichsproteinen mit bekanntem Molekulargewicht ermittelte ich für die zwei neu synthetisierten Eiweiße ein abgeschätztes Molekulargewicht von 33000 bzw. 22000. Die EB-Sensibilität dieser Proteine läßt annehmen, daß ein Zusammenhang zwischen ihnen und den von Todaro und Huebner postulierten Transformierproteinen besteht.

Dieser letzte Versuch, neue Proteine unter den durch Trypsin-Behandlung von Zellen abgelösten Proteinen zu suchen, und seine Ergebnisse bieten auch eine Erklärung dafür, warum ich in den nach dem üblichen Fraktionierungsschema präparierten subzellulären Fraktionen keine signifikanten Hinweise auf zusätzliche Proteine nach der Transformation finden konnte: Diese Proteine wurden immer schon entfernt, wenn die Zellen vor der Markierung mit radioaktivem Leucin durch Trypsin von der Wand des Zuchtgefäßes abgelöst wurden.

3.6. Elektronenmikroskopische Ergebnisse

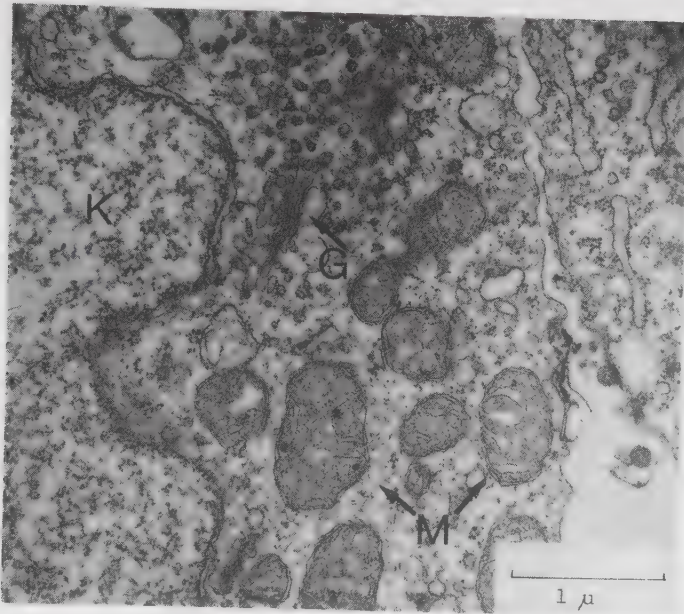


Abb. 43: Hühnerembryofibroblasten. Ausschnitt aus zwei normalen Zellen.

Erkennbar sind: Kern	- K
Golgi-Apparat	- G
Mitochondrien	- M

Abb. 44: Hühnerembryofibroblasten nach der Transformation mit Rous-Sarkom-Virus. Schräg durch das Bild verlaufen streifenförmige Anschnitte dreier Zelleiber, die von unten nach oben mit A, B und C bezeichnet wurden.

Zelle A enthält: Kern - K

Golgi-Apparat - G

Zelle B zeigt dünne Filamente (F), vermutlich Streßfasern.

Ein Viruspartikel (V) oberhalb von Zelle B zeigt

Merkmale onkogener RNA-Viren.

Es ist möglicherweise kurz zuvor aus der Zellmembran ausge-
reift.

Im Ausläufer der Zelle C zeigt sich rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER).

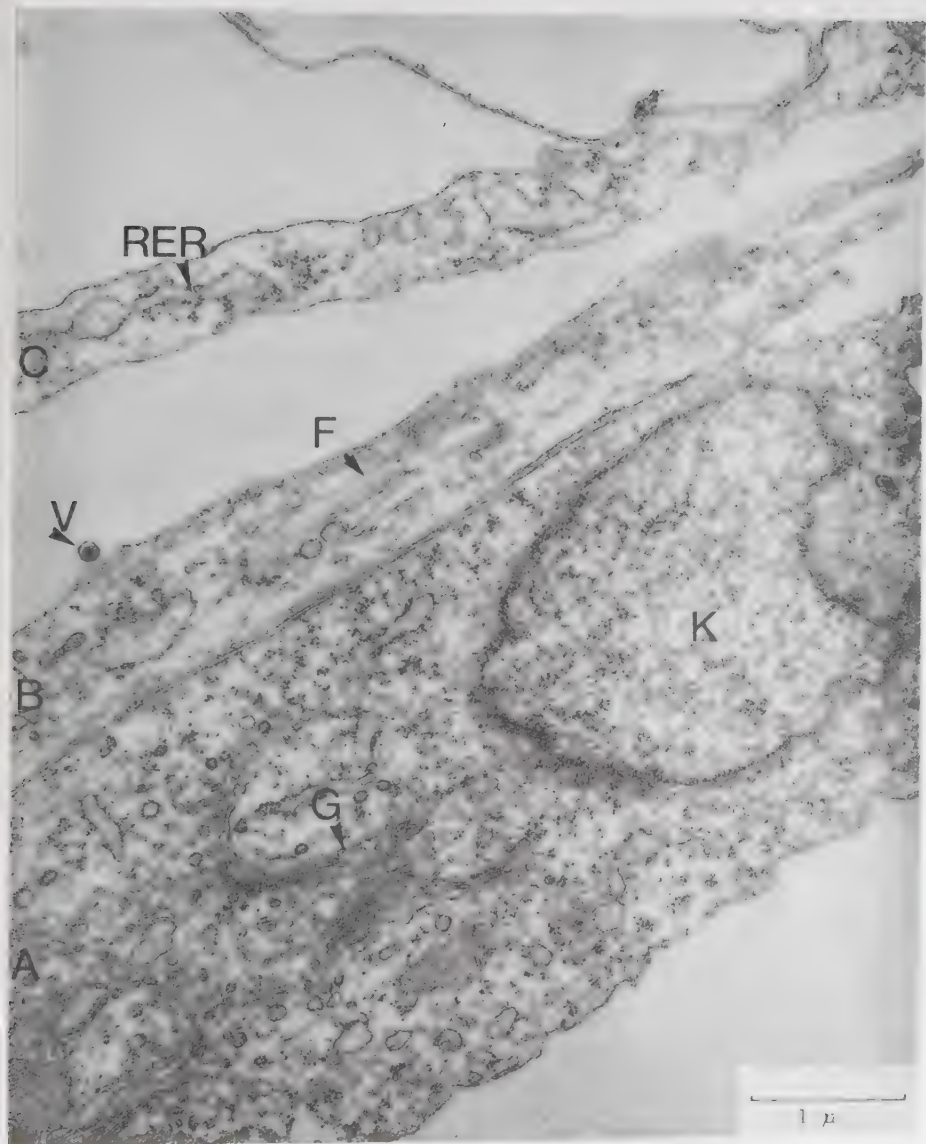
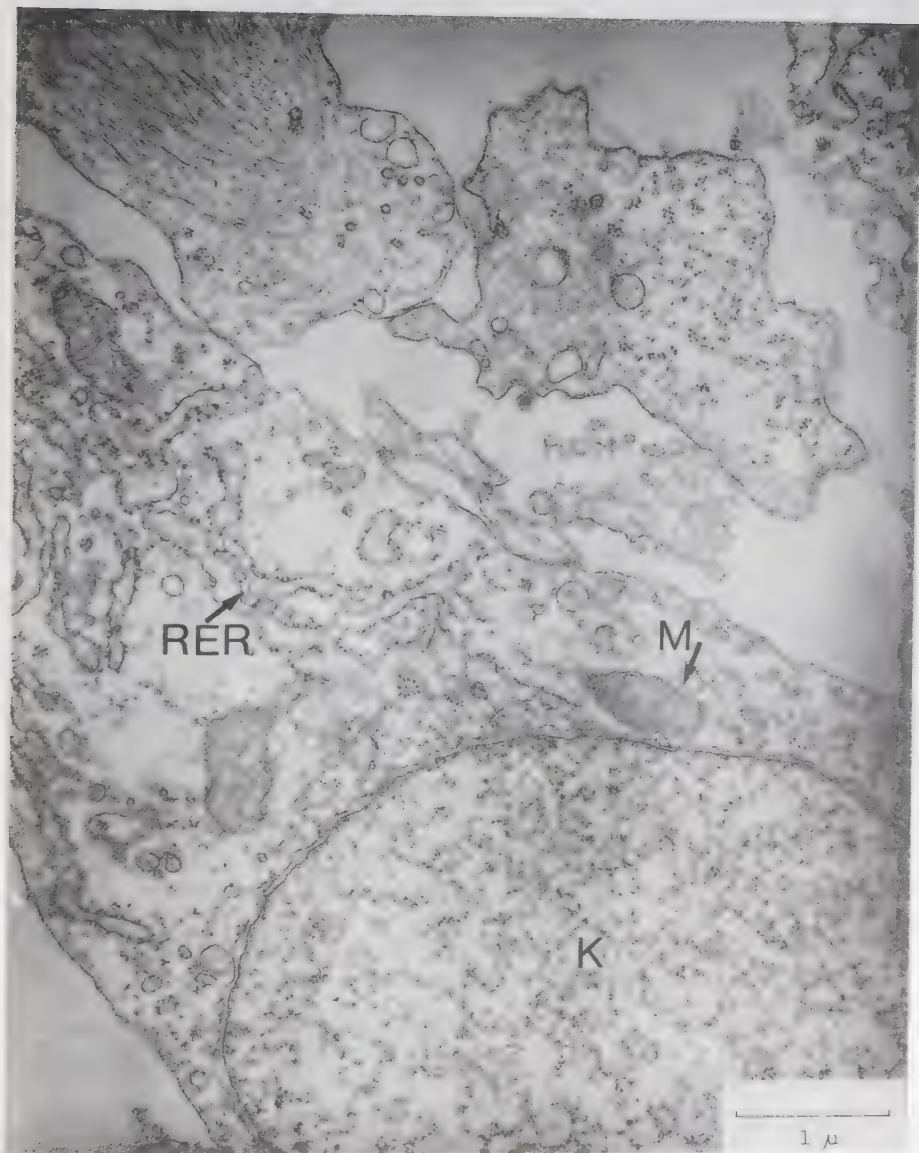


Abb. 45: Hühnerembryofibroblasten, deren Transformation mit Rous-Sarkom-Virus durch Zugabe von EB gehemmt wurde.
In der größten der angeschnittenen Zellen erkennt man

Kern	- K
Mitochondrien	- M
Rauhes Endoplasmatisches Retikulum - RER.	

Morphologisch ist kein Unterschied zu normalen HEF erkennbar.



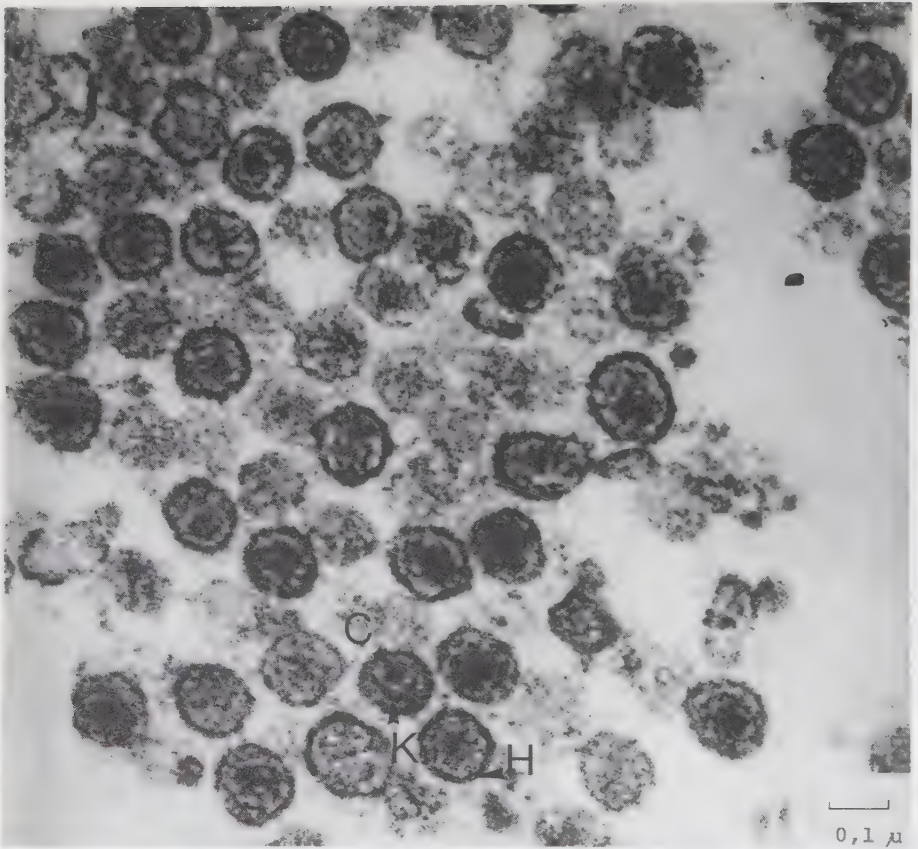


Abb. 46: Rous-Sarkom-Viren. Die Viren wurden im 100 000 x g -
Sediment aus verbrauchtem Medium transformierter Zellen
angereichert. Morphologisch sind sie gekennzeichnet durch
die Hüllenmembran (H),
die Kapsidmembran (K)
und den zentralen Kern, das sog. "core" (C).

4. DISKUSSION

Eine der wesentlichen Anregungen zu dieser Arbeit leitete sich aus der Beobachtung ab, daß EB die durch RSV induzierte Zelltransformation hemmen kann. Bisher war von EB nur bekannt, daß es hauptsächlich auf den DNA- und nicht auf den Protein-Stoffwechsel wirkt. So konnte kürzlich auch im RSV-System gezeigt werden, daß EB das Auftreten von geschlossener ringförmiger virusspezifischer DNA in infizierten Zellen verhindert und dadurch die Integration dieser DNA in die chromosomale DNA unterbindet (Guntaka et al., 1975). Auch die Befunde von Richert & Hare (1972), daß EB die Umwandlung von HEF durch RSV hemmt, sind auf diese Weise interpretiert worden. Wenn die molekularenbiologischen Untersuchungen diese Annahme auch untermauern, so geben sie keine Begründung, warum EB auch auf das Tumorstadium, also auf bereits manifest transformierte Zellen, einen Effekt ausübt. Ganz bestimmte transplantable Tumoren von Ratten und Mäusen, wie ein Mamma-Karzinom, ein Sarkom-180 und eine Leukämie Type L-1210, werden in ihrem Wachstum durch EB stark gehemmt (Kramer & Grunberg, 1973). In diesen Fällen müßte auch eine Wirkung dieses Pharmakon auf die Proteinsynthese angenommen werden, da der hemmende Effekt nicht allein durch eine Interkalation mit der DNA erklärt werden kann. Außerdem wird der Zellzyklus und damit die Vermehrungsrate der Zellen durch bestimmte Proteine und Glykoproteine an der Zelloberfläche entscheidend beeinflußt. In der Tat konnte von einigen Gruppen unabhängig gezeigt werden, daß EB und ein Analogon - der Farb-

stoff Proflavin - einen hemmenden Effekt auf die Proteinsynthese ausübt, der bei Tumorzellen besonders ausgeprägt ist (Weinstein & Finkelstein, 1967; Birkmayer & Balda, 1971; Birkmayer et al., 1972).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluß von EB auf das HEF-RSV-System untersucht. Die Frage war, inwieweit EB einen spezifischen Effekt auf die Proteinsynthese von virus-transformierten Zellen hat, und ob ein Unterschied zwischen normalen und transformierten Zellen besteht.

Am einfachsten läßt sich die Proteinsynthese durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren messen. In meinen Experimenten verwendete ich Leucin, weil es eine essentielle Aminosäure ist, die also von der tierischen Zelle nicht synthetisiert werden kann, und weil ihr Stoffwechsel relativ inert ist, sodaß neben Proteinen keine oder nur äußerst geringe radioaktive Nebenprodukte zu erwarten sind. Die Ergebnisse dieser Experimente ergaben, daß der Leucineinbau durch EB besonders in normalen nicht transformierten Zellen erniedrigt wird. Besonders davon betroffen sind die Kern- und Mitochondrien-Proteine, während der Effekt auf die mikrosomalen und cytosolischen Proteine nicht so ausgeprägt ist. Überraschenderweise fand ich bei den Tumorzellen - also den virus-transformierten Zellen - keine Erniedrigung des Leucineinbaus in die Proteine der Mikrosomenfraktion und des Cytosols. Eine plausible Erklärung für diese Befunde ist nicht leicht zu geben. Man muß jedoch berücksichtigen, daß Proteine durch Einbau von radioaktiven Aminosäuren über zwei verschiedene Wege markiert werden können: Erstens

über den sog. "Turnover", also das Wechselspiel zwischen Abbau und Neubildung; zweitens über den "Aminosäuren-Pool", also über das Reservoir an frei vorliegenden Aminosäuren, aus dem diese als Bausteine für die Proteine entnommen werden. Ist der Vorrat an freien Aminosäuren klein, dann kann man Proteine höher markieren, als wenn der Vorrat groß ist, weil dann die angebotene radioaktive Aminosäure stärker verdünnt wird, und deshalb nur ein geringer Bruchteil davon in Eiweiße eingebaut wird. Deshalb lassen sich Proteine mit raschem Turnover auch höher markieren als solche mit langsamem. Unter diesen Aspekten sind die Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit zu sehen. Es ist durchaus möglich, daß sich der Aminosäure-Pool in Gegenwart von EB in normalen Zellen stärker ändert als in virus-transformierten Zellen. Dasselbe könnte für den Turnover einiger Proteine gelten. Diese Effekte könnten für die verschiedenen Ergebnisse verantwortlich sein. Auch die gelegentlich beobachtete starke Streuung kann teilweise damit erklärt werden. Außerdem ist es durchaus möglich, daß sich die Zellen, obwohl sie zu gleichen Zeiten und unter weitgehend analogen Bedingungen markiert wurden, in verschiedenen Wachstumsstadien befanden und deshalb verschiedene Mengen an radioaktivem Leucin aufnahmen. Schließlich ist zu bedenken, daß es sich um embryonale Zellen handelte, die wesentlich andere Wachstumseigenschaften besitzen als adulte Zellen, und in denen zusätzliche Proteine gebildet werden, deren Synthese durch EB beeinflusbar ist. Daß durch eine Virusinfektion nicht nur die Nukleinsäuresynthese, sondern auch der Proteinstoffwechsel und

damit auch der Aminosäure-Pool beeinflusst werden kann, sollte noch bemerkt werden.

Es war nicht Ziel dieser Arbeit, genauere Daten über den Aminosäure-Pool und den Protein-Turnover von normalen und RSV-transformierten HEF zu ermitteln. Das wäre zu umfangreich gewesen und hätte zur eigentlichen Thematik nichts wesentliches beigetragen. Es wurde in diesen Experimenten nur untersucht, ob sich die EB-Wirkung auf die Zelltransformation in der Gesamtproteinsynthese widerspiegelt oder nicht. Nach meinen Ergebnissen ist dies nicht der Fall.

Ich mußte deshalb auf subtilere Techniken zurückgreifen, die es erlauben, die Synthese diskreter Proteine zu verfolgen.

Neben den zahlreichen chromatographischen Trennverfahren mit Ionenaustauschern oder Molekularsieben, bei denen präparativ relativ große Mengen (mindestens etwa 10 mg) notwendig sind, bietet sich die Technik der Polyacrylamid-Gelelektrophorese an. Der Vorteil dieser Methode ist der geringe Substanzverbrauch - es genügen 0,1 mg pro Elektrophorese - ,und die wesentlich schärfere Auftrennung der Proteingemische in spezifisch einstellbaren Gelgrößen. Ferner erlaubt die Methode, bei Verwendung des Detergens Dodecylsulfat das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden abzuschätzen. Vor allem die bessere Auftrennungskapazität sowie der geringere Bedarf an Substanzmengen hat mich dazu veranlaßt, auf diese Methode zurückzugreifen. An dieser Stelle sollte vielleicht betont werden, daß das größte Problem bei meinen Untersuchungen die Menge an Protein war, die ich aus den in vitro gezüchteten Zel-

len isolieren konnte. Zur Verdeutlichung sei erwähnt, daß man aus 20 Rollerflaschen zu je 840 cm^2 Wachstumsfläche etwa 0,5 g an Zellen erhielt, aus denen sich wieder etwa 200 μg Protein aus der Kern-Fraktion isolieren ließ. Mitochondrien und Mikrosomen enthielten oft noch viel geringere Mengen an Protein. Unter diesen Bedingungen war die Technik der Polyacrylamid-Gelelektrophorese die einzige Möglichkeit, nach spezifischen Proteinen in transformierten Zellen zu suchen.

Mit diesem Verfahren wurden die subzellulären Fraktionen - Kerne, Mitochondrien, Mikrosomen, Cytosol und Zellmembranen - in 20 bis 30 einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Die Etikettierungsmuster der einzelnen Zellkomponenten mit ^3H -Leucin unterschieden sich deutlich voneinander; dabei wurden die mikrosomalen und cytosolischen Proteine am höchsten markiert. Das könnte dafür sprechen, daß diese Proteine einen höheren Turnover haben als die Kern- oder Mitochondrien-Proteine. Wie man aus den Elektrophoresemustern von in Gegenwart von EB inkubierten Zellen erkennt, kommt es nicht zu einer spezifischen Hemmung einzelner Proteine, sondern zu einer allgemeinen Reduktion des Aminosäure-Einbaus. Das spricht eher dafür, daß bei normalen HEF die Proteinmarkierung über den Aminosäure-Pool erfolgt. Der veränderte Aminosäure-Pool könnte durch eine Wechselwirkung von EB mit der Transfer-RNA erklärt werden, wobei die Aminosäuren-Akzeptor-Funktion dieser Nukleinsäure erniedrigt wird (Waring, 1965). Werden aber weniger Aminosäuren an die t-RNA gebunden, dann steigt die Konzentration an freien Aminosäuren im Cytosol an, d.h. der "Pool" wird größer, und

die Markierung der Proteine nimmt ab, was leicht als Hemmung der Proteinsynthese mißgedeutet werden kann. Insofern gaben die Elektrophoresemuster deutliche Hinweise darauf, daß EB die Proteinsynthese in normalen Zellen ganz unspezifisch erniedrigt.

Bei den virus-transformierten Zellen konnte keine signifikante Erniedrigung des Aminosäure-Einbaus beobachtet werden. Mit anderen Worten, EB hat bei den transformierten Zellen keinen Einfluß auf den Aminosäure-Pool. Es wäre vorstellbar, daß die in Tumorzellen vielfach veränderten t-RNAs nicht mit EB reagieren, wodurch der Beladung dieser mit Aminosäuren nichts im Weg steht. Vergleicht man die Proteinmuster der einzelnen subzellulären Fraktionen von normalen HEF mit denen von RSV transformierten HEF, lassen sich keine besonders markanten Unterschiede feststellen. Zusätzliche Banden, von denen man sagen könnte, sie wären tumorspezifisch, treten nicht auf. Natürlich wäre es möglich, daß sich mehrere Proteine überlappen bzw. in der Elektrophorese in die gleiche Position wandern, sodaß eine Bande dann aus mehreren Proteinen bestünde. Dies könnte quantitative Unterschiede einzelner Proteinbanden erklären. Daß so eine Überlagerung auftreten kann, ist z.B. für die mitochondrialen Cytochrom B-Komponenten gezeigt worden. Obwohl mindestens zwei Cytochrom B-Moleküle existieren, findet man auf der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nur eine Bande; bei einer in vivo Markierung in Gegenwart von Proteinsynthese-Hemmern sind die Unterschiede im Etikettierungsmuster nur quantitativ. Dies gilt jedoch nur für spezielle Einzelfälle, wäh-

rend im allgemeinen diese Auftrennungsmethode anderen Verfahren überlegen ist. So konnten zwei Untereinheiten der Cytochromoxidase bisher nur auf diesem Wege aufgetrennt werden, was die Vorteile dieses Verfahrens unterstreicht (Werner, 1974). Es kann also sein, daß die Unterschiede zwischen normalen und transformierten Zellen rein quantitativ in einzelnen Proteinbanden zum Ausdruck kommen. Dann müßte man die Proteine präparativ über Säulenchromatographie aufzutrennen versuchen. Diese Variante läßt sich beim HEF-RSV-System derzeit nicht durchführen, weil viel zu wenig Material zur Verfügung steht.

Möglicherweise gibt es zwischen den subzellulären Fraktionen der normalen und transformierten Zellen wirklich keine gravierenden Unterschiede, und die zusätzlich synthetisierten Proteine sind nur in den anderen Zellbestandteilen - z.B. der oberflächlichen Schicht der Zellmembran - zu finden. Auf Grund dieser Überlegung wurde die Zellmembran der normalen und virus-transformierten Zellen näher untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß nur dann zusätzliche Proteine gefunden werden konnten, wenn die Zellen nicht durch Trypsin, sondern durch mechanisches Abschaben von der Wachstumsfläche abgelöst wurden. Wie sich zeigte, lassen sich von diesen mechanisch-isolierten Zellen mit Hilfe von Trypsin Proteine bzw. Peptide von der Zellmembran abspalten und dadurch in Lösung bringen; unter diesen Proteinen finden sich bei den transformierten Zellen einige, die im Trypsinat normaler Zellen fehlen. In den transformierten Zellen wurden zwei Proteine gefunden,

die in den normalen Zellen fehlen. Wie aus Abbildung 41 und 42 hervorgeht, wird der Aminosäure-Einbau, aber auch die tatsächliche Proteinmenge - gemessen an der Anfärbbarkeit mit Coomassie-Blau - durch die Wirkung von EB stark reduziert bzw. völlig unterdrückt. Es könnte sich bei diesen Komponenten um die von Todaro und Huebner postulierten Transformierproteine handeln. Per definitionem sollten Transformierproteine bei normalen HEF nicht gefunden werden, was nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch zutrifft. Nach den schon erwähnten Befunden von Richert & Hare(1972) sollte die Synthese der Transformierproteine durch den Phenathridinfarbstoff Ethidiumbromid gehemmt werden. Mit anderen Worten: Die Transformierproteine sollten in Gegenwart von EB nicht synthetisiert werden und im Elektropherogramm nicht nachweisbar sein. Nach meinen elektrophoretischen Ergebnissen scheint dies für beide Proteinbanden zuzutreffen: Der Aminosäure-Einbau wird durch EB fast völlig gehemmt.

Man könnte einwenden, daß die zwei in dieser Arbeit nachgewiesenen Proteine nichts mit der Transformation zu tun haben, sondern Strukturproteine von Viren darstellen, die in den transformierten Zellen gebildet werden. Dagegen sprechen jedoch mehrere Argumente: Erstens ist nicht zu erwarten, daß die transformierten Zellen keine Viren, aber Viruskomponenten in derart hohem Ausmaß produzieren, daß die Virusproteine relativ hohe Banden im Elektrophoresemuster ergeben. Außerdem ist eine Virusproduktion 8 Stunden nach Infektion noch nicht zu erwarten, da eine Freisetzung von Viren morphologisch wie biochemisch erst

nach etwa 14 Stunden zu beobachten ist (Tooze, 1973). Schließlich wird die Virusproduktion durch EB nicht beeinträchtigt (Richert & Hare, 1972). Wenn die beiden in transformierten Zellen vorkommenden Proteine Virusproteine wären, sollten sie zwar im Elektropherogramm der transformierten Zellen im Gegensatz zu normalen Zellen zu finden sein; sie sollten jedoch auch in den Zellen nachweisbar sein, die in Gegenwart von EB infiziert worden sind. Die Abbildungen 41 und 42 zeigen, daß dies nicht zutrifft.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen also den Schluß zu, daß es sich bei diesen neu synthetisierten Proteinen um Makromoleküle handelt, die bei der Transformation entstehen. Welche eigentliche Rolle sie bei der malignen Zellumwandlung und bei der Aufrechterhaltung des malignen Zustands spielen, kann aus diesen Experimenten nicht abgeleitet werden. Neben meinen biochemischen Hinweisen konnten in der Zwischenzeit von einer anderen Arbeitsgruppe immunologische Anhaltspunkte gewonnen werden, die für die Existenz von Transformierproteinen sprechen. So gelang es Rohrschneider et al. (1975), mit Hilfe eines indirekten Immunpräzipitationsverfahrens zwei Proteine zu identifizieren, die auf der Oberfläche transformierter Zellen zu finden sind. Bei virus-infizierten, aber nicht transformierten Zellen fehlten sie. Durch eine Ko-Elektrophorese von Viren, die mit ^{35}S -Methionin markiert waren, und von HEF, die nach Transformation mit ^3H -Fucose etikettiert wurden, ließ sich beweisen, daß diese beiden Proteine nicht mit Strukturproteinen von Viren identisch waren. Beide Proteine waren

Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 100 000 und 32 000. Sie wurden abgekürzt als GP₁₀₀ und GP₃₂ bezeichnet. Die von mir gefundenen Proteine hatten ein Molekulargewicht von 33 000 und 22 000. Das höher molekulare stimmt in seinem Molekulargewicht mit dem von Rohrschneider beschriebenen GP₃₂-Protein gut überein. (Die Molekulargewichtsabschätzung mit Hilfe der Gelelektrophorese hat eine maximale Genauigkeit von 5%) Diese beiden Proteine könnten identisch sein, aber es muß kommenden Versuchen überlassen bleiben, dies nachzuweisen. Daß ich das von Rohrschneider gefundene GP₁₀₀ nicht finden konnte, liegt möglicherweise daran, daß ich die Proteine mit Trypsin aus der Zelloberfläche herauslöste. Trypsin könnte als proteolytisches Enzym die abgelösten Proteine noch weiter spalten oder die Oberflächenmembranproteine nur partiell herauslösen, wodurch nieder molekulare Fragmente entstehen. Ein solches Bruchstück könnte das von mir nachgewiesene Protein mit Molekulargewicht 22 000 sein. Dieser durch Trypsin verursachte Effekt könnte durch den Versuch vermieden werden, diese Proteine mit Hilfe eines Detergens von der Zelloberfläche abzulösen; dabei sollte das ursprüngliche Molekulargewicht erhalten bleiben. Diese Experimente sind derzeit im Gange.

Geht man davon aus, daß die beiden Proteine tatsächlich Transformierproteine oder Bruchstücke derselben darstellen, bleibt immer noch die Frage offen, ob die genetische Information für diese Proteine in der Virus-RNA oder in der chromosomalen DNA enthalten ist. Würde die Virus-RNA die Transformierproteine

codieren, spräche das für die sog. "Provirus-Theorie" über die Tumorentstehung; befindet sich dagegen die Information im Zellgenom, wäre dies ein Beweis für die "Onkogen-Theorie".

Der definitive Beweis, daß es sich bei den von mir nachgewiesenen neu gebildeten Proteinen tatsächlich um Transformierproteine handelt, ließe sich nur immunologisch erbringen. Dazu müßten Antiseren gegen diese Proteine hergestellt und auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Wenn die Seren spezifische Antikörper gegen Transformierproteine enthielten, müßten sie die Transformation der Zellen verhindern können. Derartige Experimente werden derzeit von mehreren Gruppen durchgeführt. So konnte Collins (1975) in einem Mäusesystem zeigen, daß man mit spezifischen Antikörpern Tumorzellen in ihrer Vermehrung hemmen kann. In diesen Versuchen wurde ein Antiserum gegen ein Strukturprotein eines Mäuseleukämie-Virus verwendet. Durch Injektion dieses Antikörpers konnte sowohl eine aktive wie eine passive Immunisierung erreicht werden. Sowohl eine Leukämieinduktion durch Viren konnte mit einem Antiserum verhindert werden, wie auch eine bereits bestehende Leukämie durch ein Antiserum in Remission gebracht werden konnte.

Antikörper gegen tumorspezifische Transformierproteine hätten zwei wesentliche Anwendungsbereiche für die Klinik, nämlich in der Diagnostik und in der Immuntherapie maligner Tumoren. Ein monospezifischer Antikörper gegen die bei der Transformation entstehenden Proteine würde eine zuverlässige Serumdiagnostik zur Früherkennung bösartiger Krebserkrankungen ermög-

lichen. Dazu stünden verschiedene Methoden, wie Radioimmunassay oder indirekte Hämagglutinationshemmung zur Wahl. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde geben biochemische Hinweise für die Existenz von Proteinen, die bei der Transformation entstehen. Sie stellen im weitesten Sinn eine molekularbiologische Basis für eine Immuntherapie dar. Vordringlichste Aufgabe ist es daher, diese Transformierproteine zu isolieren und zu charakterisieren. Ist dieses Problem zufriedenstellend gelöst, könnte man versuchen, solche Proteine auch in menschlichen Tumorzellen nachzuweisen. Dann hätte man Antigene zur Verfügung, die zur Stimulation der Immunantwort des Patienten dienen könnten. Schließlich könnten spezifische Antiseren in Primaten oder Menschen hergestellt werden und in Form einer passiven Immunisierung therapeutisch verwendet werden. Zur Erreichung dieses Fernziels bedarf es jedoch noch aufwendiger und langwieriger Experimente sowie intensiver Studien, die nur in Zusammenarbeit mit vielen internationalen Gruppen durchgeführt werden können.-

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteinsynthese in Hühnerembryofibroblasten während der Transformation mit Rous-Sarkom-Virus wurde in An- und Abwesenheit des Farbstoffs Ethidiumbromid mit Hilfe des Einbaus der radioaktiv-markierten Aminosäure Leucin untersucht. Signifikante Unterschiede zeigten sich nur bei der Proteinfraction, die mittels Trypsin-Behandlung von der Oberfläche der Zellen abgelöst wurde. In dieser Fraktion konnten zwei Proteine mit Molekulargewicht 33 000 und 22 000 gefunden werden, die in normalen Hühnerembryofibroblasten nicht synthetisiert werden. Anwesenheit von Ethidiumbromid während der Transformation hemmt die Synthese dieser beiden Proteine. Diese Ethidiumbromid-Sensitivität ist ein wesentliches Argument dafür, daß es sich bei ihnen um Transformierproteine handeln könnte, die bei der malignen Zelltransformation eine entscheidende Rolle spielen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Attardi, B. & G. Attardi:
Expression of the mitochondrial genom in He La cells.
I. Properties of the discrete RNA components from the
mitochondrial fraction.
J. Mol. Biol. 55, 231 - 250 (1971)
2. Baltimore, D., R. McCaffrey & D.F. Smoler:
Second ICN-UCLA Symposium on Molecular Biology.
Virus Research 101 C.F. Fox, W.S. Robinson, AP, NY London
1973
3. Baxt, W., R. Hehlmann & S. Spiegelman:
Human leukemic cells contain reverse transcriptase associa-
ted with a high molecular weight viral-related RNA.
Nature New Biology 240, 72 - 75 (1972)
4. Birmayer, G.D. & B.R. Balda:
Evidence for proflavine sensitive proteins in malignant
hamster melanoma.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem 352, 780 - 790 (1971)
5. Birmayer, G.D., B.R. Balda, F. Miller & O. Braun-Falco:
Virus-like particles in metastases of human malignant me-
lanoma.
Naturwissenschaften 59, 369 - 370 (1972)
6. Birmayer, G.D., F. Miller & F. Marguth:
Oncorna-viral information in human glioblastoma.
Journal of Neural Transmission 35, 241 - 254 (1974)
7. Bowen, J.M., P.T. Allen, J.L. East, K. Marayuma, W.A. New-
ton, J. Georgiades, F.S. Priori & L. Dmochowski:
Molecular probes in studies of the relationship of viruses
to human neoplasia.
Amer. J. clin. Path. 60, 88 - 99 (1973)

8. Buck, C.A., M.C. Glick & L. Warren:
A comparative study of glycoproteins from the surface of control and Rous-Sarcoma-Virus transformed hamster cells. *Biochemistry* 9, 4567 - 4576 (1970)
9. Buck, C.A., J.P. Fuhrer, G. Soslau & L. Warren:
Membrane glycopeptides from subcellular fractions of control and virus-transformed cells.
J. Biol. Chem. 249, 1541 - 1550 (1974)
10. Collins, J.J.:
Abstracts communication
International Congress for Virology, Madrid 1975
11. Cuatrecasas, W., J.-R. Cho & S. Spiegelman:
Particles with RNA of high molecular weight and RNA-directed DNA-polymerase in human brain tumors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2789 - 2793 (1973)
12. Gallagher, R.E. & R.C. Gallo:
Type-C-RNA tumor viruses isolated from cultured human acute myelogenous leukemia cells.
Science 187, 350 - 353 (1975)
13. Guntaka, P.V., B.W.J. Mahy, J.M. Bishop & H.E. Varmus:
Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus-specific DNA in duck cells infected by avian sarcoma virus.
Nature 253, 507 - 511 (1975)
14. Keloff, G.J., M. Hatanaka & R.V. Gilden:
Assay of C-type virus infectivity by measurement of RNA-dependent DNA-polymerase activity.
Virology 48, 266 - 269 (1972)
15. Kramer, M.J. & E. Grunberg:
Effect of ethidium bromide against transplantable tumors in mice and rats.
Chemotherapy 19, 254 - 258 (1973)

16. Maurer, H.R.:
Disk-Elektrophorese
Walter de Gruyter und Co. Berlin 1968
17. Nass, H.M.K.:
Abnormal DNA-patterns in animal mitochondria: Ethidium bromide induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1926 - 1933 (1970)
18. Richert, V.J. & J.D. Hare:
Distinct effects of inhibition of mitochondrial function on Rous-Sarcoma-Virus-replication and malignant transformation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 5 - 10 (1972)
19. Rohrschneider, L.R., R. Kurth & H. Bauer:
Biochemical characterisation of tumor-specific cell surface antigens on Avian Oncorna Virus transformed cells.
Virology 66, 481 - 491 (1975)
20. Seman, G., H.S. Gallagher, J.M. Lukeman et al.:
Studies on the presence of particles resembling RNA virus particles in human breast tumors, pleural effusions, their tissue cultures, and milk.
Cancer 28, 1431 - 1442 (1971)
21. Silvestri, L.G.:
Possible episomes in eukaryotes
North-Holland Publishing Company - Amsterdam-London 1973
22. Todaro, G.J. & R.J. Huebner:
The viral oncogene hypothesis: New evidence.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1009 - 1015 (1972)
23. Tooze, J.:
The Molecular Biology of Tumor Viruses.
Cold Spring Harbor Laboratory 1973

24. Vogt, P.K.:
The genome of avian RNA tumor viruses: a discussion of four models.
In Silvestri (1973)
25. Waring, M.J.:
Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids.
J. Mol. Biol. 13, 269 - 282 (1965)
26. Weinstein, I.B. & K.H. Finkelstein:
Proflavine inhibition of protein synthesis.
J. Biol. Chem. 242, 3757 (1967)
27. Werner, S.:
Isolation and characterisation of a mitochondrially synthesized precursor protein of Cytochrome Oxidase.
Eur. J. Biochem. 43, 39 - 48 (1974)
28. Zylber, E., C. Vesco & S. Penman:
Selective inhibition of the synthesis of mitochondria associated RNA by ethidium bromide.
J. Mol. Biol. 44, 195 - 204 (1969)

Dem Vorstand des Instituts für Zellbiologie der Universität München, Herrn Prof. Dr. F. MILLER, danke ich für seine Hilfe und sein stets großes Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. GERICKE und Frau Dipl. Chemikerin HILLWIG (Farbwerke Höchst), die mir ermöglichten, mich in ihrem Labor in Frankfurt in die Techniken der Gewebekultur einzuarbeiten.

Herrn Privat-Dozent Dr. G. BIRKMAYER danke ich für die Einführung in die Methodik und in die wissenschaftliche Behandlung dieses Problems.

LEBENS LAUF

Ich, Heinz-Peter SEDLMAIER, wurde am 10. März 1951 als zweites von drei Kindern des Sparkassenoberamtsrates Peter SEDLMAIER und seiner Frau Mathilde, geb. BRANDL, in München geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule an der Wörthstraße und wechselte dann auf das humanistische Wilhelmsgymnasium in München. Dort legte ich im Juni 1970 die Reifeprüfung ab und begann anschließend das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. Im Frühjahr 1973 legte ich die ärztliche Vorprüfung mit der Note II = gut ab; danach begann ich mit den Arbeiten für diese Dissertation. Am 27. Juli 1976 beendete ich mein Medizinstudium mit dem vollständig bestandenen Staatsexamen mit der Gesamtnote I = sehr gut. Seit dem 1. November 1976 arbeite ich als Medizinalassistent im Kreiskrankenhaus Pfarrkirchen in Niederbayern.

